

Série N°
N° d'ordre :

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR LE TITRE

DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Saïd Mohamed ISHAK

PHARMACIEN

PREMIÈRE THÈSE :

**Étude de l'action peroxydasique
de l'hémoglobine**

DEUXIÈME THÈSE :

**Constitution et mécanisme d'action
des Catalases**

M. JAVILLIER : *Président*

MM. AUBEL et MONNIER : *Examineurs*

PARIS
IMPRIMERIE R. VALANTIN
176, Quai Jemmapes, 176

1940

Série N°
N° d'ordre :

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR LE TITRE

DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Saïd Mohamed ISHAK

PHARMACIEN

PREMIÈRE THÈSE :

**Étude de l'action peroxydasique
de l'hémoglobine**

DEUXIÈME THÈSE :

**Constitution et mécanisme d'action
des Catalases**

M. JAVILLIER : *Président*

MM. AUBEL et MONNIER : *Examineurs*

PARIS
IMPRIMERIE R. VALANTIN
176, Quai Jemmapes, 176

1940

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

DOYEN HONORAIRE

M. MOLLIARD

DOYEN

M. C. MAURAIN, *Professeur, Physique du Globe*

PROFESSEURS HONORAIRES

MM.	MM.	MM.
H. LEBESGUE.	MARCHIS.	Léon BERTRAND.
Emile PICARD.	VESSIOT.	WINTREBERT.
Léon BRILLQUIN.	PORTIER.	DUBOSCQ.
PÉCHARD.	MOLLIARD.	BOHN.
FREUNDLER.	LAPICQUE.	RABAUD.
AUGER.	G. BERTRAND.	CAULLERY.
DANGEARD.	ABRAHAM.	J. PERRIN.
LESPIEAU.	Ch. FABRY.	CARTAN.

PROFESSEURS

Emile BOREL.	T Calcul des probabilités et Physique mathématique	PRENANT.	T Anatomie et Histologie comparées
A. COTTON.	T Recherches physiques ..	VILLEY.	Mécanique physique et expérimentale
J. DRACH.	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure ..	COMBES.	T Physiologie végétale ..
Charles PÉREZ.	T Zoologie	GARNIE.	T Application de l'analyse à la géométrie
M. GUICHARD.	T Analyse et mesures chimiques	PÉRÈS.	Mécanique théorique des fluides
Paul MONTEL.	T Théorie des fonctions et Théorie des transformations	HACKSPILL.	T Chimie minérale
L. BLARINGHEM.	T Botanique	TOUSSAINT.	Technique Aéronaut. ...
G. JULIA.	T Mécanique analytique et Mécanique céleste.	M. CURIE.	Physique (P. C. B.) ...
C. MAUGUIN.	T Minéralogie	G. RIBAUD.	T Hautes températures ..
A. DENJOY.	T Géométrie supérieure..	CHAZY.	T Mécanique rationnelle.
L. LUTAUD.	T Géographie physique et géologie dynamique ..	GAULT.	Chimie (P. C. B.)
Eugène BLOCH.	T Physique	CROZE.	Recherches physiques ..
G. BRUHAT.	T Physique théorique et physique céleste	DUPONT.	T Théories chimiques ..
E. DARMOIS.	T Enseignement de Physique	LANQUINE.	T Géologie structurale et Géologie appliquée ..
A. DEBIERNE.	T Physique Générale et Radioactivité	VALIRON.	T Mathématiques générales
A. DUFOUR.	T Physique (P. C. B.) ...	BARRABÉ.	Géologie structurale et géologie appliquée ..
L. DUNOYER.	Optique appliquée	MILLOT.	Biologie animale (P. C. B.)
A. GUILLERMOND.	T Botanique	F. PERRIN.	Théories physiques
M. JAVILLIER.	T Chimie biologique	VAVON.	Chimie organique
Henri VILLAT.	T Mécanique des fluides et applications	G. DARMOIS.	Calcul des probabilités et Physique - Mathématique
Ch. JACOB.	T Géologie	CHATTON.	T Biologie maritime
P. PASCAL.	T Chimie générale	AUBEL.	Chimie biologique
M. FRÉCHET.	T Calcul différentiel et Calcul intégral	Jacques BOURCART	Géographie physique et Géologie dynamique.
E. ESCLANGON.	T Astronomie	M ^{me} JOLIO-CURIE	Physique générale et Radioactivité
M ^{me} RAMART-LUCAS	T Chimie organique	PLANTEFOL.	Biologie végétale (P. C. B.)
H. BÉGHIN.	T Mécanique physique et expérimentale	CABANNES.	Enseignement de Physique
FOCH.	T Mécanique expérimentale des fluides ..	GRASSÉ.	Zoologie (Evolution des êtres organisés)
PAUTHENIER.	Physique (P. C. B.) ...	PREVOST.	Chimie (P. C. B.)
De BROGLIE.	T Théories physiques ..	BOULIGAND.	Mathématiques
CHRÉTIEN.	Optique appliquée	CHAUDRON.	Chimie (P. C. B.)
LABROUSTE.	Physique du Globe ..		

Secrétaire honoraire D. TOMBECK.

Secrétaire A. PACAUD.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A SA MAJESTE MOHAMED ZAHER SHAH

ROI D'AFGHANISTAN

A

S. A. R. MARECHAL SHAH WALI KHAN
Ministre plénipotentiaire d'Afghanistan à Paris

A

S. E. ALI MOHAMED KHAN
Ministre des Affaires Etrangères
Ancien Ministre de l'Instruction Publique

A

S. E. ISLAM BEK KHODIAR KHAN
Conseiller de la Légation Royale d'Afghanistan
à Paris

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A LA MEMOIRE DE MON FRERE SAÏD MOHAMMED USSOF

*A qui je dois tout.
Dont le souvenir restera tou-
jours vivant pour moi.*

A MA MERE

*Modeste témoignage de mon
amour filial et de ma grande
reconnaissance pour tous les
sacrifices qu'elle s'est imposée
pour moi.*

A MA SŒUR

A MON FRERE

A MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR JAVILLIER

Professeur de Chimie Biologique
à la Faculté des Sciences de Paris

*Qui nous a fait le très grand
honneur de bien vouloir accep-
ter la présidence de notre
thèse.*

Hommage respectueux.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AUBEL

*Pour l'honneur qu'il m'a fait
en acceptant de faire partie de
mon Jury de thèse.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MONNIER

*Modeste témoignage de notre
respectueuse reconnaissance.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR POLONOVSKI

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie Médicale de la Faculté de Médecine de Paris.

Je tiens à exprimer ma respectueuse reconnaissance à Monsieur le Professeur POLONOVSKI, qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire et nous donner tous les moyens de mener à bien ce travail, qui nous a éclairé sans cesse par ses précieux conseils. Nous le prions de trouver ici le témoignage de notre profonde gratitude et l'hommage de notre grande admiration.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ M.-F. JAYLE

Qui a inspiré et orienté le sujet de ce modeste travail et nous a porté à tous moments son précieux concours.

Nous le prions d'agréer ici l'expression de notre profond respect et notre vive reconnaissance pour la bienveillance que nous avons toujours trouvée auprès de lui et pour sa parfaite cordialité.

A MES MAITRES DE LA FACULTE DE SCIENCE
DE PARIS ET DE MONTPELLIER

A MES MAITRES DE LA FACULTE DE PHARMACIE
DE MONTPELLIER

A MESSIEURS CRISTOL ET MONNIER
Professeurs de la Faculté de Médecine de Montpellier

A MONSIEUR LE PROFESSEUR SCHELLE
Professeur de Chimie Minérale
à la Faculté de Pharmacie de Bordeaux

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MACHIBCEUF
Professeur de Chimie Médicale
à la Faculté de Médecine de Bordeaux

A TOUS MES CAMARADES
DU LABORATOIRE DE CHIMIE MEDICALE DE PARIS
et en particulier

A MADEMOISELLE FRANCE DELAFOSSE
*dont les encouragements et
l'aide technique me furent très
précieux.*

Avant de commencer notre exposé, nous estimons qu'il est de notre devoir de témoigner notre profonde reconnaissance envers la France.

Nous avons été reçu chaleureusement dans ses Universités et partout où nos études nous ont conduit, nous avons toujours été accueilli avec la sympathie et la franchise qui sont les qualités héréditaires du peuple français.

Nous serons fier d'être l'interprète fidèle de la Science Française dans notre pays, qui a toujours entretenu, avec la France, d'étroites relations culturelles.

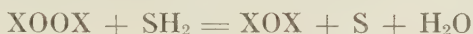
Paris, Décembre 1940.

Étude de l'action peroxydasique
de l'hémoglobine

Constitution et mécanisme d'action
des Catalases

INTRODUCTION

Les réactions de peroxydation, dans leur forme la plus générale, résultent de l'action d'un peroxyde sur un substrat réducteur selon le schéma



Au seuil de leur étude catalytique, il est nécessaire de donner un aperçu sur la chimie organique des peroxydes et de suivre l'évolution propre de leurs systèmes binaires en l'absence de catalyseur.

1. — CONSTITUTION DES PRINCIPAUX TYPES CONNUS DE PEROXYDES

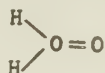
Ce chapitre de la chimie organique peut être considéré comme dérivant du peroxyde d'hydrogène, qui représente la matière première la plus employée pour la préparation des peroxydes organiques.

Sur la formule du peroxyde d'hydrogène les avis sont partagés. BRÜHL (1) pense que la meilleure illustration des propriétés de cette substance est représentée par le schéma formé par la réunion de deux oxhydrides $\text{HO} - \text{OH}$, par une liaison du type éther.

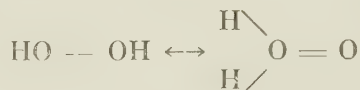
Mais les indices de réfraction et de dispersion sont trop grands pour rendre cette formule vraisemblable. Les valeurs

(1) BRÜHL Ber. d. chem. Ges. 1895 - **28** - 2847 et Ber. d. chem. Ges. 1897 - **30** - 163.

trouvées pour le peroxyde d'hydrogène sont intermédiaires entre celles de l'oxygène moléculaire et du radical oxhydryle. Par leur différence, BRÜHL évaluait la réfraction atomique de l'oxygène peroxydique ($N_D = 1859$). Mais d'autres propriétés physiques, telles que la coloration bleutée de l'eau oxygénée, analogue à celle de l'ozone, sa chaleur spécifique, plaident en faveur de la forme moléculaire de l'oxygène dans le peroxyde, qui est mieux mis en évidence par le schéma



La formation de H_2O_2 par réduction anodique de O_2 (BOSE, 2), ou par oxydation cathodique de OH a permis, à WILLSTAETTER et WEBER (3), de considérer les deux formes précédentes en équilibre



L'étude par E. LEDERLE et A. RICHE (4) de l'absorption de H_2O_2 et des peroxydes d'alcoyle dans l'ultra-violet fournit deux groupes de bandes d'absorption vers 2.100 Å et 3.000 Å. L'absorption est déviée vers les grandes longueurs d'ondes quand on suit la série suivante : peroxyde de diméthyle, peroxyde de méthyle et d'éthyle, peroxyde de diéthyle, hydroperoxyde de méthyle, hydroperoxyde d'éthyle et peroxyde d'hydrogène.

Malgré l'existence de deux groupes de bandes, il semble, à ces auteurs, qu'il n'existe pas de différence essentielle dans l'arrangement moléculaire des électrons. De toutes façons ils estiment que la formule $\text{H} - \text{O} - \text{O} - \text{H}$ est impropre et proposent une représentation avec triple échange de valences entre les 2 atomes d'oxygène tétravalent



(2) BOSE Zs. physical chem. 1901 - **38** - 1.

(3) WEBER A. 1926 - **449** - 175.

(4) E. LEDERLE Zs. Angew. chem. 1929 - **42** - 814.

A notre avis, la formule $\begin{array}{c} \text{H} \backslash \\ \text{O} = \text{O} \\ \text{H} / \end{array}$ est plus en accord avec

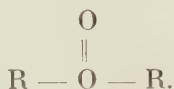
les propriétés physiques et chimiques de ce corps. Elle ne représente qu'une hypothèse de ralliement des différentes opinions émises, mais offre l'avantage de mettre en valeur la surcharge en oxygène d'une fonction organique, ce qui est la meilleure définition que l'on puisse donner du groupe des peroxydes. Ceux-ci peuvent être considérés comme résultant de la substitution des radicaux alcoyles ou acyles à un ou deux hydrogènes de H_2O_2 . On obtient ainsi :

1° à partir de la fonction alcool (BAEYER et VILLIGER (5), RIECHE.

a) les hydroperoxydes d'alcoyle

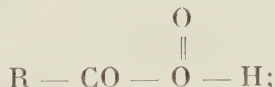


b) les peroxydes d'alcoyle ou de dialcoyle

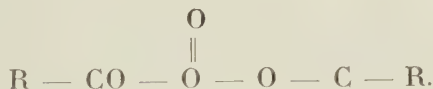


2° à partir de la fonction acide

a) les peracides



b) les peroxydes d'acyle



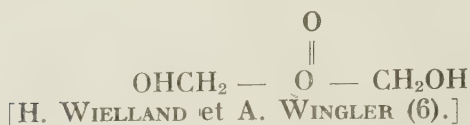
3° à partir de la fonction aldéhyde

a) l'hydroperoxyde d'oxyalcoyle

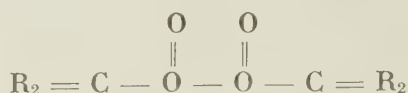


(5) BAEYER et VILLIGER - Ber. d. chem. Ges. 1900 - 33 - 387.

b) le peroxyde de dioxyméthyle



4° à partir des cétones le peroxyde de dicétone



Nous mentionnons seulement les produits de polymérisation des peroxydes d'aldehyde et de cétone, tels que l'héroxyméthylène triperoxyde $(\text{CH}_2\text{O})_6\text{O}_3 + 3\text{H}_2\text{O}$, qui ne présentent aucun intérêt pour notre étude (LEGLER, 7).

Nomenclature. — Il nous semble nécessaire de différencier les dérivés monosubstitués de H_2O_2 des dérivés disubstitués en dénommant les premières *hydroperoxydes d'alcoyle* ou *d'acyle* (peracide) et les seconds *peroxydes de dialcoyle* ou de *diacyle* (peroxydes d'acyle); cette nomenclature est conforme aux propriétés biologiques si différentes de ces deux groupes de substances, même si elle s'oppose à la dénomination habituelle des substances organiques qui ne fait jamais état de deux radicaux.

2. — LES SUBSTANCES DONNEURS D'HYDROGENE

Elles sont excessivement variées et, à l'encontre des précédentes, il est impossible de mettre en valeur dans leur molécule un groupement particulier porteur de l'hydrogène. Elles répondent toutes au schéma SH_2 . On peut distinguer :

1° des monoamines : l'aniline et ses dérivés, la paratoluidine, etc...;

2° des diamines : *o.m.p.* phénylène-diamine, diméthylparaphénylène-diamine, benzidine, etc...;

(6) H. WILLAND et A. WINGLER Lieb. A. 1923 - 431 - 301.

(7) LENGELER - Ber. d. chem. Ges. 1883 - 18 - 3,343; Lieb. A. 1883 - 217 - 381.

3° des phénols : le phénol, le thymol, l'*o.*, le *m.* ou le *p.* crésol;

4° des diphénols : pyrocatechol, gaïacol, résorcinol, hydroquinone, orcinol, pyrogallol, phloroglucinol;

5° des acides aromatiques : acide benzoïque, acide salicylique, acide pyrocatechique, acide gallique;

6° des leucodérivés d'une matière colorante : leucovert malachite, phénolphthaléine réduite (MEYER);

7° des substances biologiques plus complexes comme l'adrénaline, des flavones, la tyrosine, le tryptophane.

Par contre, formiate, acétate, oléate, stéarate, glucose, glycérol, acétaldéhyde, lactate, histidine, ne sont pas oxydés.

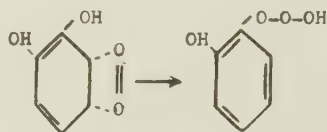
3. — EVOLUTION DES SYSTEMES BINAIRES DE PEROXYDATION

La plupart des substrats réducteurs nécessitent pour être oxydés l'intervention d'un catalyseur de peroxydation. A notre connaissance, parmi les corps précités, ne peuvent être directement et rapidement oxydés par un peroxyde, que l'acide iodhydrique, le pyrogallol et les aldéhydes ou cétones (acide pyruvique). Pour l'acide iodhydrique, la réaction est d'autant plus rapide que le milieu est plus acide. C'est l'inverse pour le pyrogallol.

Le mécanisme catalytique sera donc, dans la majorité des cas, un déclenchement de l'oxydation. Seul, l'acide iodhydrique, dans la zone de *pH* de l'action enzymatique, est oxydé directement par le peroxyde et ni les traces de fer, ni l'iode produit n'interviennent ici. Il s'agit, dans ce cas d'une activation par le catalyseur d'une réaction qui évolue d'elle-même dans les mêmes conditions expérimentales. Cependant cette différenciation est loin d'être absolue.

En outre, une certaine spécificité du peroxyde choisi à l'égard du substrat entre ici en jeu. Ainsi le pseudoperoxyde résultant de l'addition de l'oxygène moléculaire au noyau cyclique de dérivés du pyrocatechol (J. WOLFF et N. ROUCHELMANN et WHELDALE-ONSLAU) donne directement les réactions

de la benzidine ou de la teinture de gaïac. Par contre il est incapable de fixer l'hydrogène de l'acide iodhydrique.



Formule d'un pseudoperoxyde

De même l'hydroperoxyde d'oxyméthyle, isolé à l'état d'ester par RIECHE, oxyde directement la benzidine.

Le peroxyde de dioxyméthyle, transforme presque instantanément l'hydroquinone en quinone et agit sur l'acide sulfhydrique.

Enfin, les peroxydes de dialcoyle, en présence de fer, deshydrogèment les acides formique, lactique, les acides aminés qui ne sont pas des substrats pour les hydroperoxydes.

Citons également le cas de certains oxydes d'amines : l'oxyde de triméthylamine s'avère être un donneur d'oxygène (1) et oxyde très lentement l'acide iodhydrique. (D.-K. ACKERMANN, K. POLLER et W. LINNEWEH (8). Il donne également, comme H_2O_2 , la réaction à la benzidine en milieu acétique, en présence d'hémine.

Inversement, comme les peroxydes, certains oxydes d'amines peuvent devenir des donneurs d'hydrogène. C'est ce qui a lieu quand on expose une solution de bleu de méthylène en présence de gérésine à la lumière d'une lampe de 300 watts. [M. POLONOVSKI et P. DESGREZ (9).]

Il ressort de cette étude que toutes les réactions de peroxydation sont caractérisées par l'oxydation de substrats très

variés donneurs d'hydrogène par le groupement $\begin{array}{c} O \\ || \\ - O - \end{array}$ et
beaucoup plus accessoirement par le groupement $\begin{array}{c} O \\ || \\ - N - \end{array}$.

(*) Cependant cette action ne serait due pour M. POLONOVSKI et M. DESGREZ qu'aux traces de H_2O_2 contenues dans l'eau de cristallisation de cet aminoxyde.

(8) D. K. ACKERMANN - K. POLLER et W. LINNEWEH - Ber. d. chem. Ges. 1926 - 59 - 2.750.

(9) M. POLONOVSKI et P. DESGREZ C. R. Ac. Sciences 1938.

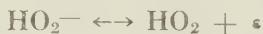
L'élément essentiel de la réaction est donc l'oxygène sur-ajouté à la molécule, lié à un atome d'oxygène par un pont de valences doubles.

Avant d'aborder l'étude de la catalyse de ce système binaire et pour mieux comprendre celle-ci, il est logique d'étudier les équilibres de dissociation des peroxydes en relations avec leurs propriétés oxydantes et réductrices.

Si paradoxale que cela puisse paraître, tous les peroxydes sont plus ou moins réducteurs vis-à-vis du permanganate de potassium en milieu sulfurique et dans le cas de H_2O_2 on peut mesurer la constante de dissociation de $k\text{H}_2\text{O}_2$ de l'équilibre



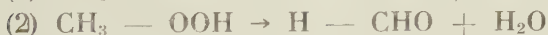
L'anion HO_2^- se dissocie ensuite suivant le schéma



l'électron libéré est responsable de l'action réductrice de cette substance, et s'accompagne d'une libération du radical HO_2 dont nous verrons l'importance dans la réaction catalysée.

Mais plus surprenant encore que celui de H_2O_2 est le comportement des hydroperoxydes d'alcyle et des peroxydes de dioxyalcoyles étudiés les premiers par RIECHE et HIRTZ (10), les seconds par H. WIELAND et WINGLER (11).

Ces peroxydes peuvent libérer de l'hydrogène moléculaire pur. C'est ainsi qu'à 70° en solution alcaline, l'hydroperoxyde de méthyle se décompose suivant la double réaction :



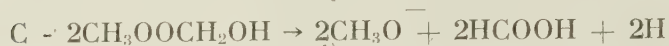
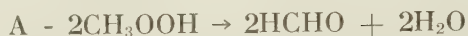
D'après RIECHE, le produit intermédiaire formé serait le

O
||
monooxydiméthyl peroxyde $\text{CH}_3 - \text{O} - \text{CH}_2\text{OH}$ comme dans
le cas de l'action d'une mol. de H_2O_2 sur 2 mol. d'aldéhyde
La preuve en est donnée par l'accélération de la réaction (1)

(10) RIECHE et HIRTZ - Ber. d. chem. Ges. 1929 - 62 - 2.458.

(11) WIELAND et WINGLER - Lieb. A. 1923 - 431 - 301.

par addition d'aldéhyde, et la chaîne des réactions serait la suivante:



Là encore, remarquons la libération du radical ionisé $\overset{\cdot}{CH_3}O$. Dans l'ensemble, il s'agit d'une réaction induite avec libération d'hydrogène actif entraînant la réduction du bleu de méthylène, même à froid en milieu légèrement alcalin.

En milieu acide, on note au contraire une prédominance marquée des propriétés oxydantes et l'acide iodydrique comme la benzidine est directement oxydée.

Le peroxyde de dioxyméthyle, isolé par WIELAND et SUTTER, a des propriétés très voisines.

Comme le précédent, il est un accepteur d'hydrogène oxyde IH , SH_2 et l'hydroquinone, avec production dans tous les cas, de formaldéhyde et d'acide formique et il fournit en outre de l'hydrogène moléculaire.

1. CATALYSEURS MINÉRAUX DE PEROXYDATION

a) *Explication du mécanisme de la catalyse des peroxydes par la théorie des réactions en chaîne.*

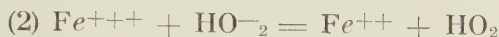
Les radicaux libres sont pour WIELAND des combinaisons non saturées de même caractère que les atomes et dont la nature particulière est due à la présence d'un atome de valence normal (SCHLENK). Ce sont donc des molécules incomplètes dont un électron de valence au moins est sans partenaire.

Cette libération des radicaux peut être catalysée par un ion minéral (J. WEISS) (12). C'est ce qui se passerait sous l'influence du fer avec l'eau oxygénée par oxydation.



(12) WEISS. JI. of. physical. chem. 1937 - 41 - 1107.

ou par réduction



Dans (1) la formation du radical OH résulte d'un simple processus de transfert d'électron



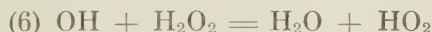
Ainsi peuvent prendre naissance OH et HO₂ celui-ci étant en équilibre avec les ions H et O₂.



La libération catalasique d'oxygène est expliquée par la réaction



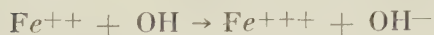
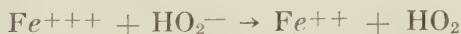
et HO₂ est régénérée par action de OH libéré en (1) et (5) sur H₂O₂.



Au cours des réactions de surface (palladium - platine colloïdal), il y a libération des radicaux OH et HO₂ qui réagissent en cascade le long d'une chaîne de réaction dont la longueur conditionne la durée et la vitesse de la réaction ainsi induite. Il est intéressant de noter que cette catalyse hétérogène qui s'accompagne de la libération de O₂ est empoisonnée par H₂, CN, IH et le pyrogallol et que le même phénomène s'observe avec la catalase.

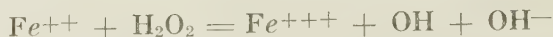
Cette catalyse devrait donc être considérée dans les 2 cas comme une action de surface.

La catalyse des réactions de peroxydation par l'ion Fe⁺⁺ pourrait être interprétée comme étant due à une action simultanée du radical OH et de l'ion HO₂⁻ produit par la dissociation de H₂O₂.



L'activation de l'eau oxygénée, par le catalyseur ferrugi-

neux, se résumerait selon cette théorie des radicaux par la réaction



Les propriétés oxydantes de OH s'exerceraient donc vis-à-vis du substrat réducteur. La durée et la vitesse de la réaction seraient conditionnées par le nombre d'oxydhydryles libérés au cours du passage du fer divalent au fer trivalent.

Les sels ferreux activent peu l'oxydation de IH par H_2O_2 en solution sulfurique (J. BRODE, 13).

Pour WOLFF et STOECKLIN, le fer n'a ici qu'une action peroxydante, c'est-à-dire qu'il se comporte comme partenaire d'une réaction stoechiométrique, mais non comme catalyseur. Si on remplace III par la paraphénylènediamine ou la benzidine on obtient des réactions colorées très nettes. Depuis longtemps on a signalé que certaines eaux minérales, à la source, donnent des réactions de peroxydation en présence de H_2O_2 ou de O_2 avec le gaïacol, l'émulsion de gaïac, la benzidine, le réactif de MEYER. Des explications variées ont été prêtées à ce phénomène qui serait dû pour M. GLÉNARD (14) à l'oxyde de fer colloïdal, pour MARTINAUD (15) à certains oxydes alcalins ou alcalinoterreux, pour FRÉSÉNIUS et LEDERER (16) au ferrocarbonate.

ARNAUD et LESCŒUR (17), Mlle J. DAVOUST (18) ont établi que ces réactions, dues à l'ion Fe^{++} , devenaient négatives par floculation et s'en sont servis comme tests de floculation. J. DAVOUST note que l'allure de la coloration est différente suivant qu'on emploie peu ou beaucoup de réactif à la benzidine. Avec 1 ou 2 gouttes de benzidine, la réaction est éphémère. Avec plus de 4 gouttes elle persiste au-delà de 15 minutes.

Ce phénomène est à rapprocher de la réaction de FENTON. Alors que les sels ferriques catalysent très faiblement l'oxy-

(13) J. BRODE J. ph. chim. 1901 - **37** - 257.

(14) M. GLÉNARD, thèse Paris - 1910 - **11** - n° 289.

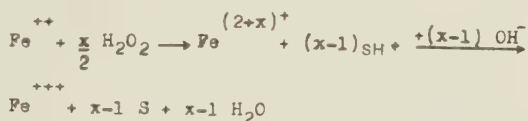
(15) MARTINAUD C. R. Ac. Sc. (1909) - t. 148, p. 183.

(16) FRÉSÉNIUS Bioch. Zs. 1930 - **226** - 139.

(17) ARMAND et LESCŒUR - Congrès Intern. d'hydrologie et de climatologie de Toulouse - 1932.

(18) J. DAVOUST - Thèse de doctorat en pharmacie, 1937 - Toulouse.

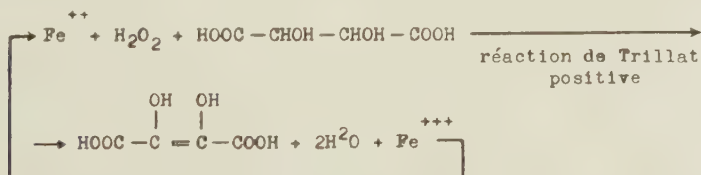
dation de l'acide formique par le peroxyde d'hydrogène, les sels ferreux activent considérablement cette réaction (WIELAND). En outre en présence du réactif de TRILLAT (tétraméthyl-diaminodiphénylméthane) les sels ferreux donnent une coloration bleue transitoire qui serait en rapport avec la formation d'un dérivé d'oxydation supérieure du fer du type du peroxyde de fer (Fe_2O_5) de MANCHOT. Cette coloration n'a pas lieu quand on remplace le sel divalent par un sel ferrique, ou bien quand on ajoute le réactif de TRILLAT après mélange préalable du sel ferreux et du peroxyde. Le schéma suivant objective la réaction



(coloration bleue avec le réactif de TRILLAT)

Si l'on prend comme substrat l'acide tartarique, la catalyse se prolonge très longtemps (FENTON) et l'on observe l'apparition d'une coloration jaune verdâtre en rapport avec le même dérivé du fer $Fe^{(2+x)+}$, qui donne la coloration bleue avec le réactif de TRILLAT. Dans ce cas le substrat oxydé,

l'acide dioxymaléique, $HOOC - \overset{\overset{OH}{|}}{C} = \overset{\overset{OH}{|}}{C} - COOH$, réduit le sel ferrique en sel ferreux et la réaction se poursuit selon le schéma



Une réaction du même genre a lieu avec le phénol (H. GOLDHAMMER, 19) et avec le fructose (20). [A.-Th. KUECHLIN,

(19) H. GOLDHAMMER - Bioch. Zs. 1927 - 189 - 81.

(20) A. Th. KUECHLIN J. BOESEKEN - Rec. trav. chim. 1928 - 47 - 1011; Bioch. Zs. 1932 - 51 - 887 ; 1933 - 261 - 411.

J. BOESEKEN.] Il se produit, lors de la deshydrogénation primaire du sucre, de l'osone qui réduit le fer trivalent.

b) *Catalyse par les ions ferreux et les sels complexes de fer.*

Il s'agit de savoir quel est le mécanisme du rôle joué par le fer dans ces réactions catalytiques.

Mentionnons d'abord que beaucoup de sels complexes du fer présentent une action catalytique de peroxydation: le bromure de fer $\alpha\alpha'$ dipyridyl (F. BLAU), le ferropentacyanure de sodium (K.-A. HOFFMANN, 21), les combinaisons complexes des sels ferreux avec les acides barbituriques (A.-V. BAEYER, 22), les sels ferreux avec l'isonitroso dimédon (H. HAAS, 23), W. KUSTER, 24); mais en général les sels complexes comme les ferrocyanures et les ferricyanures n'acceptent pas ou seulement très lentement l'hydrogène de l'acide iodhydrique, du pyrogallol, du gaïacol, du leucovert malachite, qui sont, par contre, rapidement oxydés par le chlorure ou le sulfate ferrique oxydation qui est cyanorésistante. Il y a même une petite activation de la catalyse par l'ion CN, quand on ajoute à 1 molécule de fer 6 molécules de cyanure. Les combinaisons complexes du fer, sauf celle de l'oxyquinoléine 1 — 8 donnent toutes la réaction à la benzidine-eau oxygénée (R. BERG, 25).

Dans les complexes du fer, le fer est tellement masqué et solidement attaché que les échanges de valence ne sont pas possibles (MICHAELIS). On peut en déduire cette notion très importante qu'il existe deux sortes de substrats oxydables.

a) Ceux qui cèdent leur hydrogène à un composé d'addition relativement inerte, $Fe - H_2O_2$, incapable d'un changement de valence: le type de ces substrats est la benzidine l'émulsion de gaïac ou le réactif de MEYER.

(21) K. A. HOFFMANN A. 1900 - 312 - 1.

(22) A. BAEYER - A. 1863 - 128 - 300.

(23) P. HAAS Soc. 1907 - 91 - 1333.

(24) W. KUSTER H. Zs. 1926 - 155 - 177.

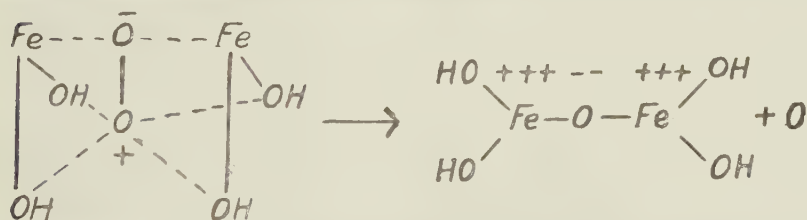
(25) R. BERG JI f. prakt. ch. 1927 - 115 - 178.

b) Ceux qui nécessitent un changement de valence du fer et dont le plus caractéristique est l'acide iodhydrique.

Quelle que soit l'opinion des différents auteurs, tous sont actuellement d'accord pour voir dans cet effet catalytique du fer un rapprochement des 2 partenaires donneur et accepteur d'hydrogène. Il y a formation préliminaire d'un complexe relativement stable entre le fer, le peroxyde et le substrat.

D'après WIELAND, seuls les sels ferreux peuvent servir de point de jonction et lors de la dissolution du complexe, la catalyse est suspendue, par leur oxydation en sels ferriques, sauf dans le cas où une substance réductrice les régénère.

Il y a plusieurs façons de concevoir le processus oxydatif : c'est d'abord la vieille hypothèse de MANCHOT (26) et de BACH et ENGLER supposant la formation d'un peroxyde de fer du type Fe_2O_5 , exprimé par A. JOB (27) de la façon suivante : cet auteur explique la catalyse de peroxydation par un changement de valences du fer. L'addition de l'oxygène sur le fer donnant naissance à un peroxyde de fer du type Fe_2O_4 , un transport interne des électrons, des atomes de fer sur la molécule d'oxygène amènerait la libération d'un atome d'oxygène neutralisé alors que l'atome négatif porteur d'une double charge deviendrait le pont jeté entre les 2 fers trivalents.



L'oxygène atomique libéré se fixerait sur la substance organique. Pour l'activation de H_2O_2 il suffit dans ce schéma de substituer H_2O_2 à O_2 .

BAUDISCH et WELO (28) expliquent la catalyse par la formation d'un complexe de coordination, le peroxyde se fixant sur le fer et servant de pont de liaison entre celui-ci et le substrat. Le transfert interne des électrons entraîne la scission du

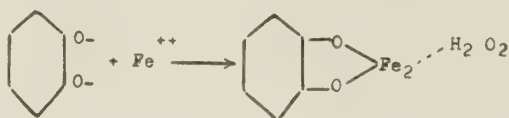
(26) W. MANCHOT et W. PFLAUM Zs. anorg. ch. 1933 - 211 - 1.

(27) A. JOB - Bull. Soc. Chim. 1923 - 33 - 1561.

(28) BAUDISCH et WELO - J. of. biol. Chem. 1924 - 61 - 261.

complexe coordinatif en libérant le fer et le substrat sous une forme oxydé. D'après F. HABER et J. WEISS (29) le fer déclenche la mise en route d'une chaîne de réactions par libération de radicaux OH et O₂H (voir théorie des chaînes d'oxydation, page 4). La réaction n'est interrompue que lors de la formation du fer trivalent qui est lente.

Mais WIELAND fait jouer au fer un rôle purement passif. La catalyse s'effectuerait sans échange de valences et seul le fer divalent posséderait l'affinité nécessaire à l'édification du complexe. A. DE SZENT GYÖRGYI (30) se rallie à cette hypothèse et pour lui le temps essentiel de la catalyse est la formation du complexe coordinatif par addition sur le fer ou le cuivre d'un substrat qui présente une structure spécifique avec deux oxydryles en ortho. Le fer lié coordinativement devient le sommet d'un cycle pentagonal sur lequel la molécule d'oxygène ou de peroxyde s'additionne



Dans un tel schéma, le fer activé catalyse le transfert d'électrons de l'orthodiphénol sur le peroxyde qui jouerait le rôle d'un simple accepteur passif des électrons véhiculés. Le peroxyde ainsi chargé de deux électrons se neutraliserait au contact des ions positifs (H⁺) de l'eau. Il s'agit ici d'une extension de la théorie de deshydrogénation de WIELAND au cas du peroxyde considéré comme une substance inerte et la propriété essentielle du catalyseur serait de lier coordinativement le donneur et l'accepteur d'électrons.

Une pareille hypothèse semble à M. POLONOVSKI et M. F. JAYLE (31) peu conforme à l'observation des réactions de peroxydation activées par les sels de fer. D'une part ceux-ci présentent une affinité marquée pour le peroxyde qui se traduit par la formation d'un complexe d'activation « Fer-peroxyde », dont le stade actif donne lieu à des réactions de

(29) F. HABERT et J. WEISS Naturw. 1932 - 20 - 948.

(30) AIDE SZENT GYÖRGYI - Bull. Soc. Ch. Biol. 1938 - 20 - 848.

(31) M. POLONOVSKI et M. F. JAYLE et Mlle GLOTZ - Bul. Soc. ch. biol. 1939 - 1 - 49.

colorations spécifiques comme celle de TRILLAT. D'autre part la spécificité de la réaction ne vise que le groupement peroxy-

O
||
dique — O —

la constitution de donneur d'hydrogène étant variable et indifférente.

La réaction dans le cas de l'acide iodhydrique évolue d'elle-même, ce qui ne saurait être imputable à une forme active latente du substrat réducteur, mais bien à la surcharge du peroxyde en oxygène atomique, qui représente le premier stade d'activation du récepteur électronique.

Une preuve supplémentaire du bien-fondé de cette conception n'est-elle pas donnée par l'activation d'une molécule d'eau oxygénée par une molécule d'aldéhyde. Il se forme par addition une substance instable, qui n'est pas une vue de l'esprit puisqu'elle a été isolée par A. RICHE sous forme d'ester, et elle porte l'oxygène peroxydique à son 2^e stade d'activation, caractérisé par une réaction positive à la benzidine ou à la teinture de gaïac.

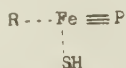
La combinaison $\text{HCHO} + \text{H}_2\text{O}_2$ était considérée par G. WOKER (32) comme un modèle de peroxydase. Elle n'est autre que l'hydroperoxyde d'oxyméthyle instable qui se transforme rapidement en peroxyde de dioxyméthyle (WIELAND et WINGLER), forme stabilisée incapable de donner des réactions peroxydantes avec les réactifs mentionnés.

On peut donc considérer que le peroxyde présente un premier stade d'activation de l'oxygène moléculaire. En se fixant sur une substance qui présente à son égard une affinité marquée d'ordre physique ou chimique, il donne lieu à une transposition moléculaire qui porte l'oxygène peroxydique à un *deuxième stade d'activation*, mis en évidence par les réactions peroxydantes (STOECKLIN); celles-ci présentent, avec la catalyse de peroxydation, une différence fondamentale : l'impossibilité d'oxyder les substrats qui nécessitent un échange de valence du fer (II — pyrogallol, etc...). Si le composé d'addition est formé à partir d'un sel ferreux ionisé,

(32) G. WOKER Ber. d. chem. Ges. 1916 - 49 - 2311; 1917 - 50 - 1321.

la réaction est éphémère et irréversible, le dérivé actif n'étant qu'une forme de passage entre le fer bivalent et le fer trivalent; le fer divalent ne devient un catalyseur de peroxydation que par l'adjonction d'une substance réductrice qui le ramène à chaque instant à sa forme initiale. Le dérivé d'oxydation supérieure du fer représente donc *le troisième stade d'activation*, caractérisé par l'oxydation des substrats phénoliques et de IH qui ne sont pas déshydrogénés par les composés d'addition des peroxydes avec une substance aldéhydique ou avec les ions ferrugineux complexes.

On peut donc représenter un modèle de catalyseur de peroxydation par le schéma suivant dans lequel le fer est lié au peroxyde (P), au substrat (SH) et au réducteur (R) qui réduit le fer trivalent en fer divalent.



Le réducteur assure la reversibilité du système à catalyse minérale et par suite l'équilibre entre le composé instable intermédiaire et la forme initiale. Cet équilibre conditionne la durée et la régularité de la catalyse.

5. CATALYSE PAR UN COMPLEXE ORGANO-FERRIQUE: L'HEMATINE

Ce raisonnement par analogie devient une réalité quand on choisit comme modèle catalytique, l'hématine dans laquelle le fer est appendu à deux atomes d'azote du squelette porphyrinique.

L'étude spectrographique de ce composé organo-ferrique fournit les caractéristiques d'absorption du complexe d'addition qu'il donne avec H_2O_2 ou un autre hydroperoxyde (HAUROWITZ, 33). Avec la formation de ce composé d'addition stable on voit apparaître la propriété fondamentale de l'héma-

(33) HAUROWITZ - Enzymologia 1937 - 2 - 9 ; 1937 - 4 - 139.

tine qui est à la base de la spécialisation des catalyseurs biologiques de peroxydation (fig. 1).

*Spectre d'absorption de l'hémine et du dérivé d'addition
« hémine - H_2O_2 » d'après F. HAUROWITZ*

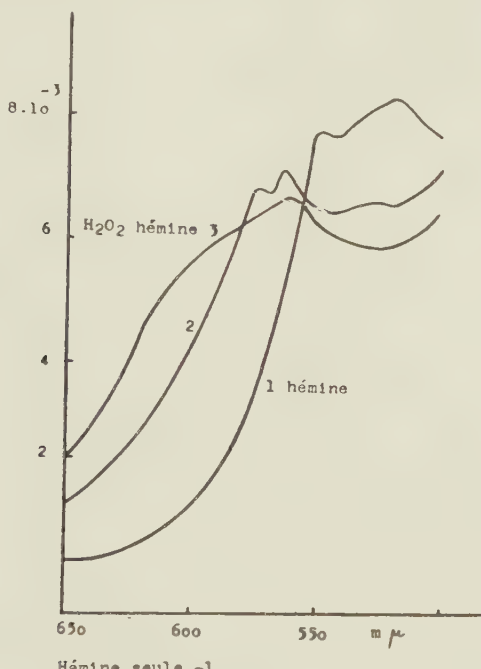


FIGURE 1

Le dérivé de fixation de peroxyde sur le fer de notre modèle minéral était tellement instable qu'on ne pouvait le déceler que par un artifice de coloration. L'introduction du fer dans un noyau organique a pour premier effet de lui donner une stabilité dont nous verrons l'importance sur la cinétique catalytique, et de conférer au fer trivalent une grande affinité à l'égard du peroxyde. Comme les sels ferreux, l'hématine possède la propriété d'activer l'oxygène et l'eau oxygénée. En outre elle est capable de faire subir au peroxyde d'hydrogène une nouvelle transformation qui le détruit en oxygène moléculaire et en eau. Nous verrons plus loin que cette nouvelle propriété, inhérente au noyau organique, n'est qu'une spécialisation de son activité peroxydasique. R. KUHN

et L. BRANN (34) ont étudié les propriétés catalytiques de l'hématine et de ses dérivés. Ils ont montré qu'il suffit d'apporter à la porphyrine d'infimes modifications pour changer qualitativement et quantitativement son activité catalasique et peroxydasique.

Ainsi la mesohématine obtenue par hydrogénation des groupements vinyliques, a perdu totalement son activité catalasique; son pouvoir peroxydasique a diminué et son *pH* optimum situé entre 5 et 5,2 pour l'hémine s'est porté entre 6,4 et 6,5.

L'activité de la dihydroématine est très voisine de celle de l'hémine.

L'estérification d'un seul groupement carbonyle fait disparaître presque totalement les propriétés catalytiques.

Les produits de la dégradation oxydative de l'hématine et le noyau porphyrinique n'ont aucune propriété catalytique.

Il est particulièrement intéressant de noter l'influence de certaines bases azotées sur cette catalyse. La réaction d'oxydation de l'acide iodhydrique est 5 fois plus accélérée par l'hémine-pyridine que par l'hémine-phosphate.

Selon MICHAELIS, la fixation des substances tétracycliques azotées sur l'hématine augmente le potentiel d'oxydoréduction négatif de l'hémine et ainsi s'explique, par ce changement de l'énergie libre du catalyseur, la variation de sa spécificité à l'égard du substrat. Il en est de même pour l'hématine imidazole; cette base active beaucoup plus l'action peroxydasique de l'hémine que son action catalasique. (W. LANGENBECK, 35.) A. KREBS (36) obtient des résultats positifs avec la nicotine et la pyridine, mais négatifs avec l'histamine.

6. — CATALYSEURS BIOLOGIQUES

a) *Constitution.*

L'étude de l'hématine se prolonge naturellement par celles des peroxydases végétales. Car il est actuellement prouvé que ce groupement prosthétique constitue la fraction active de ces enzymes chez lesquels elle se trouve fixée par adsorption à la surface d'une micelle protéique. R. WILLSTAETTER

(34) R. KUHN et L. BRANN - Ber. d. chem. Ges. 1926 - **59** - 2370.

(35) W. LANGENBECK - Ber. d. chem. Ges. 1932 - **65** - 1750.

(36) A. KREBS - Bioch. Zs. 1928 - **193** - 347 ; 1929 - **209** - 32.

et A. STOLL (37) avaient conclu un peu trop hâtivement que le fer représentait une impureté des peroxydases et que sa proportion était d'autant plus faible que l'enzyme était plus sélectionné.

Alors qu'une préparation de PZ (1) = 560 avait une teneur en fer de 0,46 %, celle-ci n'était que de 0,064 pour une autre préparation de PZ = 3070. En employant la même technique de purification, R. KUHN, D.-B. HAND et M. FLORKIN (38) constatèrent que l'enzyme était fortement coloré en brun et présentait une absorption entre 400 et 450 m μ . Par réduction au moyen de S₂O₄ Na₂, en présence de soude dilué ou de pyridine, des bandes apparaissent dans le jaune et le vert et ont une situation identique à celles de l'hémochromogène, soit à 557 et 527 m μ ainsi qu'on le voit sur les spectres de ces auteurs reproduits ci-contre (fig. 2, 3, 4).

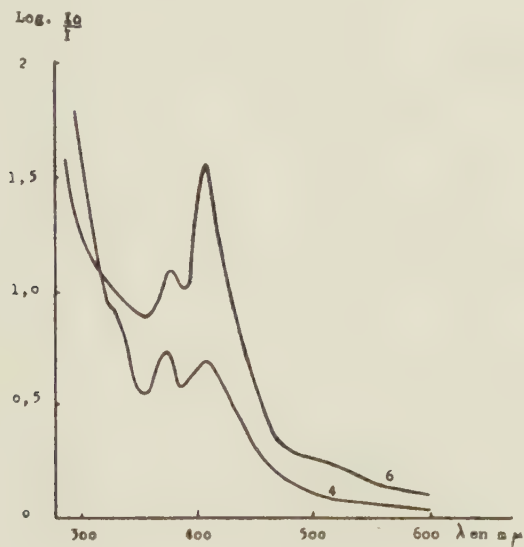


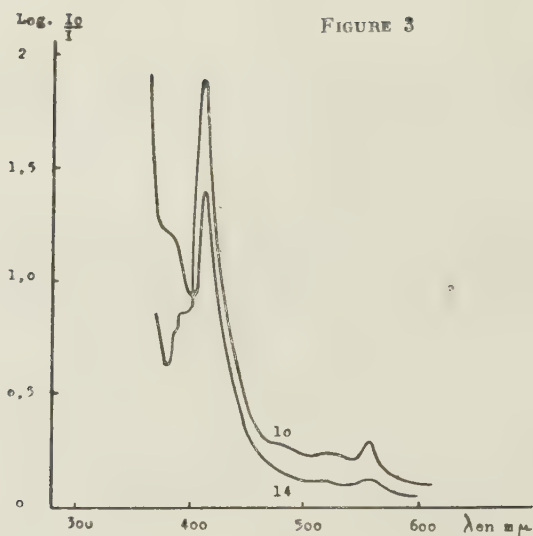
FIGURE 2

Absorption d'une solution de peroxydase
 Peroxydase P. Z. 3.400 40.5 P. E. dans 1 cm³ sous ép. 2,5 mm.
 — 500 11,9 — — —
 d'après R. KUHN, D.-B. HAND et M. FLORKIN

(37) R. WILLSTATTER et STOLL - Lieb. A. 1918 - 416 - 21.

(38) R. KUHN D. B. HAND et M. FLORKIN - Zs. phys. chim. 193 L - 201 - 255.

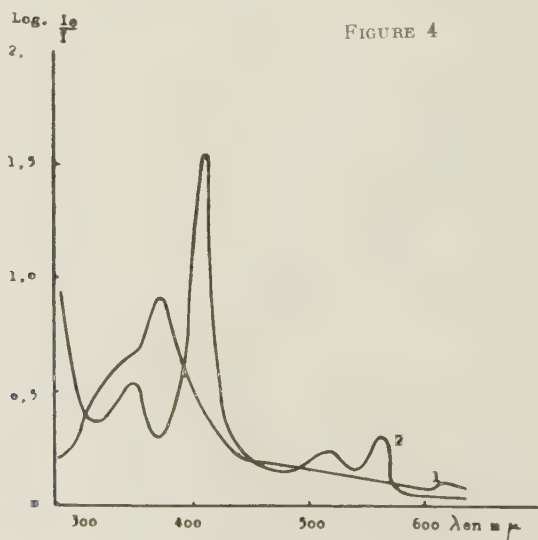
(1) PZ = Purpurogallinzahl voir plus loin p.



Spectre d'absorption d'une solution de peroxydase réduite
d'après R. KUHN, D. B. HAND et M. FLORKIN

Perox. n° 10 PZ 1710 34,9 PE ds. 1cm³ sous 5 mm épais.

— n° 14 1080 17,5 — — — — —



Absorption de l'hémine

d'après R. KUHN, D. B. HAND et M. FLORKIN

Sol. 1 - 0,1 mgmg hémine dans 1 cc NaOH N/10 0,1 mm épais.

Sol. 2 - 0,20 — — 2 cc — - + 0,50 cc pyrid.
+ 0,20 hydrosulfite (0,016 gr. S₂O₄N₂) 1 mm épais.

L'absorption de la bande située à 420 m μ est, d'une façon approchée sinon absolue, proportionnelle à l'activité peroxydase.

K.-A.-C. ELLIOT et D. KEILIN (39) reprennent cette étude spectrographique et obtiennent des résultats analogues à ceux des auteurs précédents pour les préparations peu actives de peroxydase. Ils identifient le spectre obtenu à celui de la protohématine, mais estiment que la presque totalité de l'hématine se trouve sous forme d'hématine acide libre. Le spectre de la parahématine n'apparaît qu'entre pH 9 et 10,5 par combinaison avec une base azotée présente dans le milieu.

Par addition de pyridine et d'hydrosulfite, les bandes se confondent parfaitement avec celles de l'hémochromogène. Ils estiment que si l'enzyme est un composé de l'hématine il ne représente qu'une fraction de l'hématine totale observée. J.-B. SUMMER et S.-F. HOWELL (40) étudient le spectre de peroxydases de figes, et considèrent que l'hématine est bien le groupement actif des peroxydases dans lesquelles elle existerait sous forme réduite et en relation avec une base azotée.

Fr. AXMACHER et H. OELBRACHT (41) concluent également que l'hématine est la fonction active des peroxydases. Ils se basent sur l'effet des inhibiteurs et des accélérateurs de l'action enzymatique et trouvent une relation entre l'augmentation ou la diminution de l'activité et la teneur de la préparation en hématine. La question n'est pas encore définitivement tranchée, mais tout porte à croire que la constitution des peroxydases est conforme au schéma :

hématine - base azotée - protéine

la base azotée servant de trait d'union entre la protéine et son groupement prosthétique ferrugineux, qui selon le schéma de WILLSTAETTER serait adsorbé à la surface de la micelle protéique. La dissociation observée par KEILIN résulte peut-être de l'action des réactifs employés au cours de la préparation.

Dans ce complexe, le fer, malgré l'opinion de SUMMER et HOEWEL doit se trouver sous la forme trivalente. Seuls les

(39) K. A. C. ELLIOT et D. KEILIN, Proc. of the royal Soc. B. 1934 - 104 - 210.

(40) J. B. SUMMER et S. F. HOWELL - Enzymologia 1936 - p. 133.

(41) Fr. AXMACHER et H. OELBRACHT - Bioch. Zs. 1934 - 271 - 441.

produits chimiques se combinant à Fe^{+++} comme le ferrocyanure et le sulfocyanure exercent une action inhibitrice de l'action peroxydasique contrairement à ceux qui agissent sur Fe^{++} (ferricyanure) et ont une influence très faible sur la catalyse. En outre la méthémoglobine a une activité catalytique presque double de celle de l'hémoglobine : le peroxyde se fixe plus facilement sur l'hématine que sur l'hème.

La constitution de notre modèle biologique étant ainsi fixée, il nous faut maintenant le situer dans le cadre des catalyseurs d'oxydation, en rechercher la spécificité, étudier la cinétique de son action et en prouver l'utilité au sein du métabolisme cellulaire.

La définition d'une peroxydase est indissolublement liée à sa spécificité et au mécanisme de son action catalytique.

Nous avons vu que la spécialisation des catalyseurs de peroxydation augmentait au fur et à mesure que l'on s'élevait dans la hiérarchie de leur constitution organométallique. On est frappé ici par le fait que la prise en charge de l'hématine par une micelle protéique non seulement augmente considérablement son activité catalytique, mais encore dissocie électivement l'action peroxydasique des actions oxydasiques et catalasiques qui sont de ce fait annulées. Il suffit pour les faire réapparaître de dissocier le complexe en libérant l'hématine.

b) *Action catalytique.*

Le complexe enzymatique, dont le modèle le plus simple nous est fourni par l'hémoglobine et la méthémoglobine, présente la propriété fondamentale, comme les sels ferreux et l'hématine, de donner avec l'eau oxygénée un produit d'addition observé pour la première fois par ROBERT (42). Quand on ajoute du peroxyde d'hydrogène à une solution de méthémoglobine, celle-ci vire du brun au rouge violacé, et le composé ainsi formé présente trois bandes diffuses d'absorption, situées respectivement vers 600-584 $m\mu$, 558-545 $m\mu$ et 513-500 $m\mu$. ROBERT le considère comme un composé d'ad-

(42) ROBERT - Arch. phys. 1900 - 82 - 603.

dition Méthb. H_2O_2 très instable se transformant rapidement en Méthb. HAUROWITZ (43) confirme cette observation, mais pense qu'il s'agit d'une transformation de la Methb. acide en Méthb. alcaline sous l'influence de l'eau oxygénée, le spectre de la Méthb. alcaline étant, selon cet auteur, très voisine de celui du composé obtenu. La question a été reprise par HAUROWITZ, puis par KEILIN et HARTREE (44) qui en font l'objet d'une étude spectrographique et manométrique très précise KEILIN et HARTREE font agir sur une solution de méthémoglobine électrodialysée, soit de l'eau oxygénée, soit de l'hydroperoxyde d'éthyle. Dans les deux cas, les bandes spectrales de la Méthb. sont remplacées par deux bandes diffuses : la première à 589 m μ , non symétrique, présente un maximum d'absorption du côté des grandes longueurs d'onde; la deuxième est symétrique et centrée sur 515 m μ . La troisième bande décrite par ROBERT (513-600 m μ) appartiendrait à la Méthb. libre. L'étude quantitative les conduit aux conclusions suivantes :

1° le composé rouge violacé s'obtient par action d'une molécule de peroxyde sur une molécule de Méthb. et répond à la formule Méthb. - H_2O_2 (tableaux I et II);

2° il est très instable et se transforme rapidement et irréversiblement en Méthb.;

3° la catalase est sans action sur lui et ne détruit que l'excès d'eau oxygénée qui n'a pas réagi sur la Méthb.

Ainsi la Méthb. donnerait avec les peroxydes, des composés d'addition du même type que ceux que l'on obtient avec CO, KCN, NO, $FN\alpha$, SH_2 . Sans en rapporter de preuves expérimentales, KEILIN et HARTREE généralisent leur conception à l'hémoglobine : celle-ci serait transformée d'abord en Méthb. qui fixerait ensuite une molécule de peroxyde pour donner le composé d'addition.

L'interprétation de ces auteurs cadre mal avec certaines propriétés de ce dérivé d'addition : son irréversibilité, son instabilité très grande dans une certaine zone de pH, etc...

D'autre part, l'examen des deux tableaux (I et II) montre

(43) F. HAUROWITZ Zs. für physiol. chem. 1924 - 137 - 1.

(44) D. KEILIN et E. HARTREE - Proc of the royal. Soc. 1935 - B - 117 - 1.

TABLEAU I

Dosage manométrique de l'excès de H_2O_2 qui n'a pas réagi sur la Méthb. après décomposition par la catalase, d'après D. KEILIN et E.-F. HARTREE.

Méthb cm3 par at. g. de Fe		Solution tampon	cm3	H ₂ O ₂ M	Catalase cm3	O ₂ total p. 100 libéré
2,0	4,7×10 ⁻³	1,10	0,20	5,3×10 ⁻²	—	10
2,8	2,5×10 ⁻³	0,02	0,28	2,5×10 ⁻²	0,2	0
2,0	7,0×10 ⁻³	0,80	0,20	7,0×10 ⁻²	0,3	20
—	—	3,00	0,20	4,0×10 ⁻²	0,1	89
—	—	2,80	0,20	3,6×10 ⁻²	0,3	111
—	—	2,82	0,28	5,0×10 ⁻²	0,2	95

TABLEAU II

Détermination spectrographique quantitative du dérivé Méthb- H_2O_2 formé, d'après D. KEILIN et E.-F. HARTREE

N°	Méthb par	H_2O_2	Pourcentages		H_2O_2/Fe
	at. g. de Fe	M	Méthb libre	d' H_2O_2 -Méthb	
1	5×10^{-4}	0	100	0	0,00
2	5×10^{-4}	$1,7 \times 10^{-4}$	70	30	0,33
3	5×10^{-4}	$3,4 \times 10^{-4}$	40	60	0,67
4	5×10^{-4}	$5,0 \times 10^{-4}$	16	84	1,00
5	5×10^{-4}	$6,7 \times 10^{-4}$	6	94	1,33
6	5×10^{-4}	$8,3 \times 10^{-4}$	2	98	1,67

qu'il y a une proportionnalité entre sa formation et le peroxyde ajouté jusqu'à un pourcentage qui ne dépasse pas 60 %. Au-delà il est nécessaire de faire réagir plus d'une molécule et demie de peroxyde (1.65 mol de H_2O_2 par molécule de HbO_2 pour en obtenir 98 %. M. POLONOVSKI et M. F. JAYLE réfutent également l'hypothèse de D. KEILIN et E.-F. HARTREE d'après laquelle le peroxyde, dans un premier temps, méthémoglobinisait le pigment sanguin et, dans un second, s'additionnerait à lui. Ces auteurs, par une étude manométrique, établissent que les peroxydes ne sont pas des agents méthémoglobinisants et ceci est conforme aux travaux de MAGAT qui injecte à l'homme et aux animaux de grandes quantités de lécithine perhydrite sans déterminer de trouble respiratoire. Frappés par toutes ces contradictions, M. POLONOVSKI et

M.-F. JAYLE (31) ont repris l'étude spectrographique des dérivés d'addition HbO_2 - peroxyde d'éthyle et obtenu, avec l'hémoglobine et la méthémoglobine, les spectres que nous reproduisons (fig. 5 et 6).

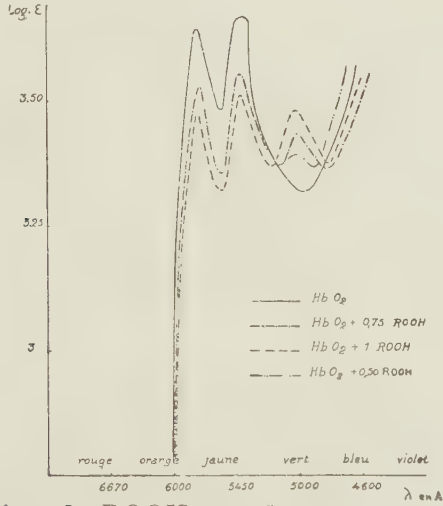


FIGURE 5

Action de ROOH sur l'oxyhémoglobine.

(M. POLONOVSKI et M.-F. JAYLE.)

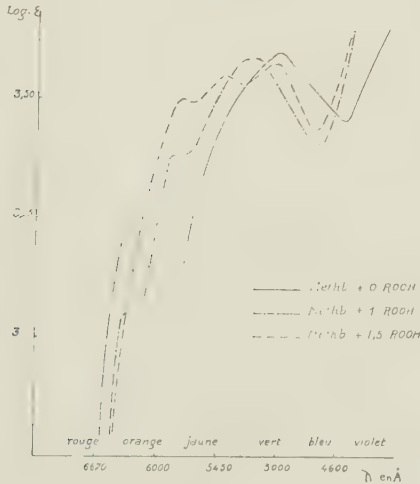


FIGURE 6

Action de ROOH sur la méthémoglobine

(M. POLONOVSKI et M.-F. JAYLE.)

Ils considèrent que la bande de la Méthb. située à 630 m μ est caractéristique de la transformation de Fe^{II} en Fe^{III} et consécutivement de la perte des valences de coordination de cet élément. Au contraire la bande qui apparaît à 500 m μ dans le cas du composé « Méthb. peroxyde », comme dans celui de « HbO₂ peroxyde », n'aurait pas la même signification et traduirait un changement de valence quelconque du fer, c'est-à-dire le passage de Fe⁺⁺ à Fe⁺⁺⁺ ou Fe⁺⁺⁺⁺.

L'absorption dans le jaune serait en rapport avec les valences coordinatives du fer qui lui permettent de donner des composés d'addition.

L'association des trois bandes prouverait que le peroxyde porte le fer à un état d'oxydation compatible avec la conservation des valences de coordination. Continuant par l'étude de la fixation du peroxyde sur la Méthb. (fig. n° 5), ces auteurs notent que :

1° la bande située dans le rouge disparaît presque complètement;

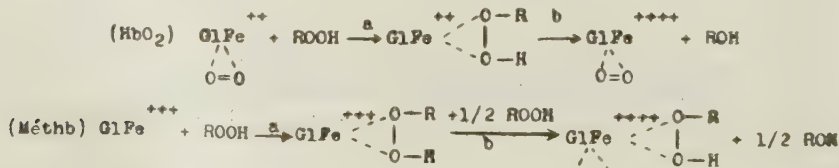
2° la bande située dans le vert est déportée vers les grandes longueurs d'ondes (maxima à 526 m μ);

3° une bande diffuse apparaît dans le jaune vers 585 m μ , association qui, là encore, exprimerait la formation d'un dérivé d'oxydation de l'hémoglobine capable de donner des combinaisons d'addition réversibles, propriété que la méthémoglobine à fer trivalent avait complètement perdue.

Donc non seulement le peroxyde ne fait pas disparaître cette propriété fondamentale de l'hémoglobine, mais il la lui redonne quand elle l'a perdu.

M. POLONOVSKI et M.-F. JAYLE supposent que l'addition d'une molécule de peroxyde à une molécule d'hémoglobine est suivie d'une superoxydation du fer l'amenant à un état d'oxydation supérieure très instable.

L'instabilité de ce composé, à partir d'une certaine concentration en peroxyde expliquerait sa consommation en peroxyde et par suite l'écart mesuré par KEILIN et HARTREE quand le pourcentage du dérivé formé dépasse 60 % (tableau II). Le schéma suivant représente sa formation :



Dans un premier temps le peroxyde se fixe sur le chromoprotéide à une place différente de celle de l'oxygène qui n'est pas déplacé pour donner un dérivé d'addition; c'est le premier stade de l'activation du peroxyde mis en évidence par les réactions à la benzidine (a).

On peut supposer que l'oxygène est fixé sur le noyau pophyrinique et le peroxyde sur l'élément métallique pour lequel son affinité a été prouvée au début de cet exposé.

Le fer passe ensuite à un état d'oxydation élevé en libérant le radical réduit du peroxyde. C'est le 2^e stade de l'activation au cours duquel les corps phénoliques et IH sont oxydés rapidement. Le mécanisme est identique dans le cas de la méthémoglobine mais ici, le composé d'addition se forme plus rapidement que dans le cas de HbO_2 où l'encombrement stérique occasionné par la molécule d'oxygène gêne la fixation du peroxyde sur le fer.

En conclusion, il ne s'agit pas d'un composé d'addition inerte et dissociable de l'hémoglobine comme ceux que fournissent l'oxygène ou l'oxyde de carbone, mais d'une fixation du peroxyde sur un autre point de la molécule, qui est suivie rapidement d'une activation par déformation de la forme stable du peroxyde soumis aux champs de force de la micelle chromoprotéique, et d'une décharge de la couche des électrons de valence du fer qui acquiert ainsi la propriété d'oxyder un substrat donneur d'hydrogène sous sa forme la plus stable.

L'existence d'un tel composé est complètement en désaccord avec la conception de WIELAND qui considère que les peroxydases sont des polyphénol-déhydrases anoxytropes fonctionnant sans échanges de valence du fer par l'activation du substrat réducteur, l'eau oxygénée ne représentant dans la réaction que l'accepteur spécifique de l'hydrogène véhiculé.

Cette façon de voir est une négation des faits, car s'il est prouvé que certaines substances phénoliques ont une certaine affinité pour ces enzymes, par contre nous verrons que l'acide iodhydrique, à partir d'une certaine concentration optimum n'a pas d'influence sur la cinétique de la réaction. Encore faut-il pour mettre en évidence l'affinité de l'enzyme pour le gaïacol opérer à de très faibles concentrations en H_2O_2 comme l'a montré B.-J.-G. MANN (45).

(45) B. J. G. MANN - Bioch. Journ. 1931 - 25 - 1928.

Pour une concentration de H_2O_2 de 0,264 M, la rapidité de la catalyse d'une peroxydase végétale augmente toujours en fonction de la teneur en gaïacol. Avec 0,088 M H_2O_2 , on note, pour une très forte concentration en gaïacol, une diminution de la vitesse d'oxydation; mais la forme des courbes ne semble pas prouver que le substrat réducteur entre en compétition avec le peroxyde qui seul est le substrat spécifique de l'enzyme. On observe par contre avec l'enzyme végétal une courbe typique quand on fait varier la concentration du peroxyde. WILLSTAETTER et POLLINGER (82) avaient déjà mis en évidence l'inhibition de l'enzyme par un excès de peroxyde et établi qu'elle n'était pas en rapport avec la destruction de l'enzyme qui retrouvait, entière, son activité initiale après destruction catalasique de l'eau oxygénée. Le maximum de la courbe répond à une teneur en peroxyde comprise entre 10^{-1} et 10^{-2} M. Mais sa position et sa hauteur dépendent de deux autres facteurs : les concentrations respectives de l'enzyme et du substrat réducteur.

La courbe obtenue (fig. 7) est typique et permet de calculer

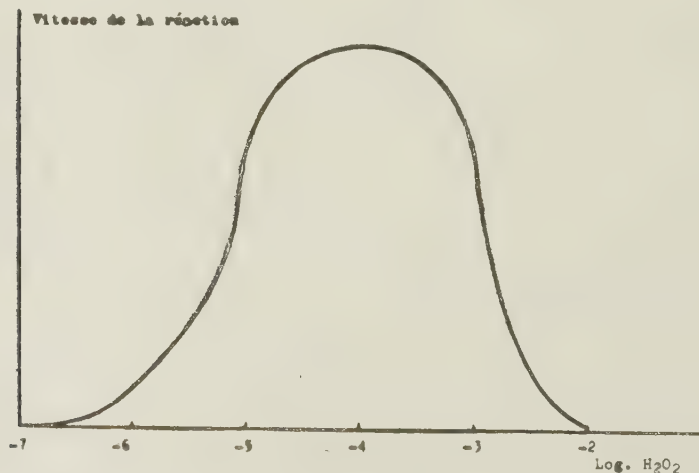


FIGURE 7

Influence de la concentration du peroxyde sur l'activité d'une peroxydase (P. G. MANN).

la constante de MICHAELIS qui exprime l'affinité de l'enzyme.

Elle est égale pour la peroxydase végétale à 6.10^{-5} (MANN).

L'étude spectrographique, comme celle de l'affinité, comme la filiation du mécanisme des catalyseurs ferrugineux de peroxydation, met bien en lumière que le substrat activé par les peroxydases est le peroxyde et non le corps réducteur. On peut trouver une preuve supplémentaire à cette affirmation dans l'étude de la spécificité de ces enzymes.

H. WIELAND et H. SUTTER mesurent, par la méthode de WILLSTAETTER, l'activation par la peroxydase végétale de toute une série de peroxydes organiques. Ils concluent que les peroxydes bisubstitués comme les peroxydes de diéthyle, de disuccinyle, de dioxyméthyle ne sont pas activés alors que tous les monosubstitués le sont : hydroperoxydes d'alcoyle, peracides, etc...

La spécificité de ces enzymes vise donc le groupement

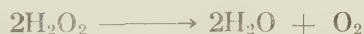
O

||

— O — H. Nous verrons à l'occasion de l'étude de l'action catalytique de l'hémoglobine que cette spécificité présente des modalités selon l'enzyme utilisé.

M. POLONOVSKI et M.-F. JAYLE (46) ont montré l'existence, dans le plasma sanguin, d'une hydroalcoyloperoxydase sans effet sur l'eau oxygénée.

Quant au donneur d'hydrogène, il peut être excessivement variable comme l'indique la liste de la page . Une seule exception connue à cette règle est fournie par la catalase qui a la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec départ d'oxygène moléculaire



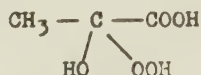
HAUROWITZ a montré que la catalase, comme la peroxydase, donne un dérivé d'addition avec l'eau oxygénée, qui ainsi activée est capable d'oxyder une deuxième molécule d'eau oxygénée qui sert de substrat réducteur comme l'indique la réaction de décomposition. Mais la différence entre catalase et peroxydase est moins bien définie depuis que KEILIN et HARTREE ont montré, qu'en présence d'eau oxygénée naissante, la catalase présente des propriétés peroxydasiques.

(46) M. POLONOVSKI et M. F. JAYLE. Bul. Soc. ch. biol. 1939 - 21 - 66.

Ainsi, couplée au système de l'aminodéshydrase, elle devient capable de catalyser l'oxydation d'un substrat réducteur. On a trop abusé des propriétés naissantes des substances; il est plus logique d'admettre que l'eau oxygénée ainsi formée se lie à certains groupements organiques aldéhydiques, cétoniques ou alcooliques, selon un équilibre.



Ainsi d'après G. SEVAG (47) l'acide pyruvique réagirait plus vite avec H_2O_2 que la catalase et il se formerait un peroxyde intermédiaire



Il en est de même avec le méthylglyoxal. La catalase agirait comme catalyseur de peroxydation sur le dérivé de gauche et comme desmolase sur H_2O_2 quand celle-ci dépasse un certain seuil et devient toxique. En effet, en présence de peroxyde de baryum ou d'éthyle, elle oxyde l'alcool en aldéhyde et rentre-rait, comme peroxydase, dans le sous-groupe des hydroalcoyloperoxydases.

c) Définition des peroxydases.

Ce sont des enzymes susceptibles d'additionner et d'activer

O
||

un peroxyde possédant le groupement — O — H, et de le rendre apte à oxyder un substrat réducteur inerte de formule générale SH, dont le type est l'acide iodhydrique, la vitesse de la réaction catalysée s'inscrivant *linéairement* en fonction du temps.

Une telle définition excluerait l'hémoglobine du groupe des enzymes biologiques de peroxydation, car l'activité du pig-

(47) G. SEVAG Lieb. A. **507** - 92 - Bioch Zs. 1933 - **267** - 211. Jl. of. Exp. Med. 1934 - **60** - 45.

ment sanguin s'inscrit selon une courbe exponentielle, si l'on choisit l'acide iodhydrique comme substrat. L'hémoglobine s'avère être un modèle incomplet de peroxydase et M.-F. JAYLE (48) a montré qu'il suffisait de substituer à IH l'acide ascorbique pour obtenir une catalyse régulière. Il en est de même avec le pyrogallol (WILLSTAETTER). Cependant dans tous les cas, la courbe finit par s'incurver. Le système $R\text{-OOH} - HbO_2 -$ acide ascorbique a un pH optimum à 4,4 et évolue comme le système d'une peroxydase végétale. La transformation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique s'inscrit linéairement au début de la réaction et se poursuit assez longtemps. L'acide ascorbique a dans ce système un double rôle : il est le substrat oxydable et potentialise l'action de l'hémoglobine. L'évolution d'un tel système présente donc toutes les caractéristiques d'une réaction peroxydasique par la régularité et la continuité de sa cinétique, par sa thermostabilité et enfin par sa spécificité relative qui s'oppose dans le schéma suivant (2) à celle des peroxydases végétales (1).

(1) $H_2O_2 -$ peroxydase-flavone-acide ascorbique.

(2) $ROOH - HbO_2 -$ acide ascorbique.

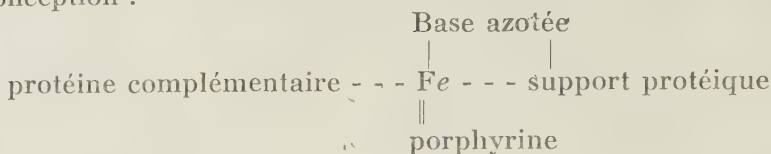
Le système de l'hémoglobine est également capable d'oxyder la cystéine à pH 6 et le glutathion à pH 7.

L'hémoglobine, enzyme incomplet de peroxydation, acquiert donc un fonctionnement catalytique vraiment comparable à celui d'une peroxydase quand son système peroxydasique est tamponné par une substance réductrice qui a un rôle de protection et permet l'utilisation du dérivé instable d'oxydation supérieure dans une zone de pH où il est particulièrement instable. Ici c'est le substrat lui-même qui protège l'hémoglobine contre l'action oxydante du peroxyde et régularise son activité.

On peut déduire de cette étude sur la constitution de la peroxydase que celle-ci est formée par une fraction active, la protohématine, absorbée ou unie à la surface d'une micelle protéique par une base azotée et protégée par une protéine qui a pour but de régulariser la catalyse en la rendant indépendante du pouvoir réducteur du milieu ambiant ainsi que

(48) M. F. JAYLE - Bul. Soc. ch. biol. 1939 - 1 - 14.

de son action peroxydante. Le schéma suivant résume cette conception :



d) *Coperoxydases.*

M. POLONOVSKI et M. JAYLE ont donné à cette représentation une preuve manifeste en mettant en évidence dans le plasma sanguin une matière protéique qui a la propriété de se fixer sur l'hémoglobine et à laquelle ils donnent le nom d'haptoglobine (de ἅπτω se fixer et globine).

L'haptoglobine se fixe équimoléculairement sur le pigment du sang, déplace le *pH* optimum de l'activité peroxydasique vers l'acidité et donne à ce catalyseur toutes les caractéristiques d'une peroxydase végétale, la libération d'iode devenant régulière, prolongée et s'inscrivant linéairement en fonction du temps.

La molécule de peroxyde, dans un premier temps, est fixée par adsorption sur le complexe enzymatique. Soumise à l'action des surfaces actives du catalyseur elle est déformée, et en tire l'énergie nécessaire à la rupture du pont peroxydique qui livre la molécule sous une forme activée



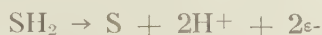
Le composé d'addition se mute alors en dérivé d'oxydation supérieure sous l'effet du peroxyde activé et le fer attire, dans sa couronne périphérique, les électrons du substrat réducteur dont les hydrogènes chargés positivement vont se décharger au contact des ions OH^- de l'eau.

e) *Systèmes biologiques de peroxydation.*

Nous allons maintenant envisager le rôle de ces enzymes en intégrant leurs systèmes dans le cycle des oxydations

biologiques, leur utilité étant intimement liée à la production de peroxydes. Mais au préalable considérons comment ceux-ci prennent naissance.

WIELAND a établi que la pièce fondamentale de la catalyse oxydative est la déshydrogénése, enzyme capable de mobiliser les hydrogènes d'un substrat oxydable comme l'indique la réaction



La déshydrogénése présente une spécificité marquée à l'égard du substrat et elle charge électriquement l'accepteur d'hydrogène, substance complémentaire de l'oxydation. Les électrons sont véhiculés sur une chaîne de transporteurs, celle de KEILIN par exemple.

$\text{SH}_2 \rightarrow$ déshydrogénése $\rightarrow$ cytochrome I $\rightarrow$ cytochrome II $\rightarrow$ cytochrome III $\rightarrow$ ferment hémique $\rightarrow \text{O}_2$.

Au terme de leur trajet, ils réduisent l'hémine ferrique en produisant de l'eau.

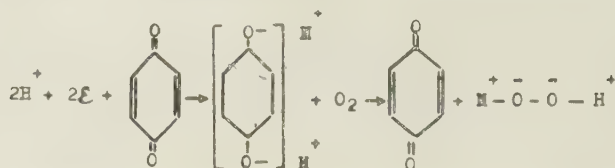
Le ferment rouge autooxydable, transforme son fer divalent en fer ferrique suivant la réaction



Les 2 atomes de fer en s'autooxydant ont libéré 2 électrons qui ont ionisé la molécule de O_2 en O_2^{--} et celle-ci par action sur 2 H^+ s'est transformée en peroxyde d'hydrogène.

Ainsi l'eau oxygénée prend-elle naissance dans le cas des systèmes anoxytropes. Mais il arrive souvent que la déshydrogénése soit oxytrophe ou bien encore qu'un accepteur intermédiaire soit autooxydable. Dans le premier cas l'oxygène accepteur est directement chargé des électrons, dans le second le transporteur réagit suivant le schéma.

Il en est de même avec les o-diphénols dérivés du pyrocathécol et avec le ferment jaune.



Il y a production de peroxyde d'hydrogène chaque fois qu'il y a autooxydation et les preuves expérimentales de sa production biologique sont multiples (G. HARRISON et S. THURLOW, 50) :

THURLOW utilise dans ce but la polyphénoloxydase du champignon; il inhibe la catalase par l'acide cyanhydrique et trouve positive les réactions qualitatives de H_2O_2 (acide titanique).

On peut également associer la réaction de SCHARDINGER à un système peroxydasique (H. WIELAND, D. KEILIN et HARTREE). Le substrat oxydable peut également être l'acide lactique, un nitrite (C.-J. DAVIS, 50), l'alcool (acétobacter peroxydans), le réactif de Nadi (D.-C. HARRISON), la paraphénylènediamine, l'alcool, l'aminodéhydrase (H.-A. KREBS) ou l'uricase (KEILIN). En présence de l'aminodéhydrase, la catalase agit comme enzyme de peroxydation.

Enfin le fait que l'action de ces bactéries s'accompagne de la production de peroxyde a été signalé dès 1875 par GILBERT et FOURNIER (51), qui remarquent que le développement du pneumocoque sur du sang défibriné de lapin cause un changement de coloration du milieu qui vire au brun verdâtre; par examen spectroscopique ils mettent en évidence la formation de méthémoglobine. En 1913 BUTTERFIELD et PEABODY (52) en font la première étude qualitative, montrant que le principe actif est présent dans les extraits de pneumocoques. Mc. LEOLD et V.-W. GORDON (53) expliquent, les premiers, le mécanisme de cette oxydation par production d'un peroxyde

(49) G. HARRISON et S. THURLOW - Bioch. Jl. 1925 - 19 - 175.

(50) DAVIS G. J. Bioch. Zs. 1934 - 267 - 202.

(51) GILBERT A. et FOURNIER L. C. R. Soc. Biol. 1896, 48.

(52) BUTTERFIELD (E.E.) et PEABODY (F.W.) Journ. of exp. Med, 1913, 17, 5, 587.

(53) Mc LEOLD et GORDON (J.W.) Journ. Path. et Bact. 1922, 25.

par les cultures de pneumocoques et de divers bacilles. O.-T. AVERY et H.-J. MORGEN (54) identifient le peroxyde formé qui est sensible à la chaleur et décomposé par la catalase. Il s'agit de l'eau oxygénée qui transforme l'hémoglobine en méthémoglobine. AVERY, O.-T. et J.-M. NEILL établissent que les extraits stériles du pneumocoque, ne contenant pas de cellules vivantes, effectuent cette transformation. Ces extraits sont préparés à l'abri de l'air à partir de cultures jeunes de pneumocoques en voie de croissance, et cultivées en anaérobiose. La formation de peroxyde résulte de l'action de l'oxygène moléculaire sur le système déhydrasique. Mais il existe une différence essentielle entre les extraits de pneumocoques exposés à l'air et ceux qui sont préparés en anaérobiose; quand on ajoute à un extrait aéré, une solution d'hémoglobine cristallisée, dépourvue de catalase, celle-ci est rapidement oxydée en méthémoglobine, tandis qu'en présence de catalase l'oxydation n'a pas lieu. Au contraire les extraits, en anaérobiose, transforment l'hémoglobine aussi rapidement en présence qu'en l'absence de catalase. La tension d'oxygène a une grosse importance, comme l'indique les chiffres empruntés à NEILL et AVERY (55).

Pression O ₂	HbO ₂	Méthb-formée
---	---	---
0 m/m	0 %	15 %
20 m/m	50 %	168 %
710 m/m	100 %	27 %

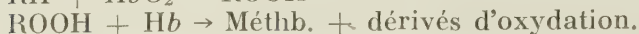
La pression optimum est de 20 mm, à laquelle on a une quantité égale d'hémoglobine et d'oxyhémoglobine. On est donc en présence d'un phénomène paradoxale : sous pression réduite d'oxygène et en présence de catalase, c'est-à-dire dans les conditions où l'eau oxygénée, si elle se formait, serait instantanément détruite, on observe l'oxydation de l'hémoglobine par le même processus que celui qui est mis en œuvre par le peroxyde.

NEILL et AVERY interprètent ces résultats expérimentaux en supposant la formation intermédiaire d'un peroxyde orga-

(54) AVERY O.T. et M.J. MORGEN, B. St. Platt. Bioch. Journ. - 21 - 19, 1927.

(55) NEILL J.M. et AVERY O.T. The j. of. exp. Méd. 1923 - 39, 257.

nique non détruit par la catalase; ce peroxyde durerait le temps du processus oxydatif du bacille ou de son extrait et se transformerait en présence d'un excès d'oxygène en eau oxygénée.



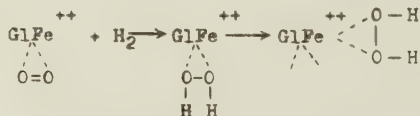
Dans cette réaction, HbO_2 est le donneur d'oxygène et l'hémoglobine réduite le substrat oxydable. Le bleu de méthylène est réduit dans les mêmes conditions. NEILL, poursuivant la même expérience sous huile, en anaérobiose, observe que dans une 2^e phase, la méthémoglobine est réduite en hémoglobine.

Dans tous les cas envisagés : formation de H_2O_2 , réduction de bleu de méthylène, oxydation de l'hémoglobine, réduction de l'oxyhémoglobine, c'est le même système déhydrasique qui détermine la réaction.

Aussi est-il plus logique de dire avec M. POLONOVSKI et M.-F. JAYLE que l'hydrogène ainsi mobilisé peut utiliser comme accepteur soit l'oxygène moléculaire, soit le bleu de méthylène, soit l'oxyhémoglobine, soit enfin la méthémoglobine.

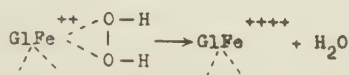
Et cette simplification dans le raisonnement permet d'exclure certaines contradictions manifestes de l'interprétation de NEILL et AVERY. On conçoit mal en effet que le peroxyde intermédiaire imaginé par ces auteurs se transforme en H_2O_2 sur la seule influence de l'oxygène.

D'autre part, M. POLONOVSKI et JAYLE (31) ont établi par un faisceau d'arguments chimiques, biochimiques, spectrographiques et manométriques que l'action d'un peroxyde transforme l'hémoglobine en un dérivé supérieur d'oxydation qui a gardé la propriété de fixer l'oxygène. Si on fait jouer, à l'hémoglobine, le rôle d'accepteur, l'hydrogène se fixe à la molécule d'oxygène liée coordinativement au pigment sanguin. L'eau oxygénée ainsi formée réagit sur le fer de la molécule.

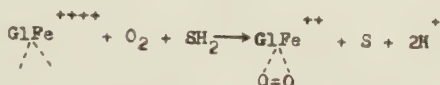


La catalase est sans action sur le complexe d'addition (KEILIN et HARTRÉE).

Dans un deuxième temps, il y a formation du dérivé d'oxydation supérieure.



Ce dernier en présence de O_2 et de substrat se transforme en HbO_2 suivant la réaction

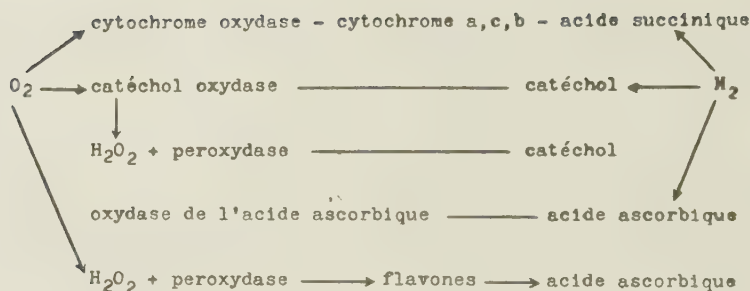


En l'absence de substrat ce dérivé se transforme lentement en méthémoglobine.



Il est possible qu'en présence des déhydrases tissulaires, à faible pression d'oxygène, les propriétés peroxydasiques de l'hémoglobine soient utilisées dans des systèmes analogues.

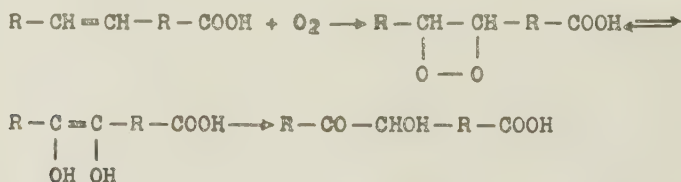
En faisant jouer un rôle biologique à l'oxygène dissous dans le sang et à l'oxygène combiné, on peut rendre compte non seulement de l'action peroxydasique de l'hémoglobine des globules rouges et du muscle, mais encore de celle de la catalase du plasma. Sous une forte tension, l'oxygène dissous va en effet, en fixant une molécule d'hydrogène, donner naissance à une molécule d'eau oxygénée que la catalase détruira instantanément. Mais quand la tension diminue, l'oxygène fixé sous forme de HbO_2 fait fonction d'accepteur et le peroxyde ainsi formé sera utilisé au cours d'un nouveau processus d'oxydation biologique. Il est impossible actuellement de situer l'importance d'un pareil système d'oxydation. Il permet simplement d'envisager sous un jour nouveau le rôle biologique de l'hémoglobine. Celui des peroxydases végétales est maintenant bien établi et le schéma suivant de SZENT GYORGYI l'objective parfaitement.



Cependant on ne peut s'empêcher d'observer que les systèmes d'oxydation biologique du type ci-dessus représenté ne tiennent pas compte de l'existence dans les tissus végétaux de substance non saturées qui additionnent l'oxygène moléculaire (GALLAGHER, 56).

L'expérience selon laquelle l'essence de thérébenthine vieillie oxyde la teinture de gaïac en présence de peroxydase rappelle l'intérêt de ces peroxydes. ARAKAWA (57) a montré que les teintures vieilles de digitale, valériane, cantharide, etc... ont la même propriété et que les peroxydes ainsi formés sont activés par la peroxydase du lait.

Le cas de l'autooxydation des graisses est particulièrement intéressant. D'après G.-W. ELLIS (58) et HINBERG G. HOLLAND, la fixation de l'oxygène moléculaire se ferait de la façon suivante :



L'héméine et les caroténoïdes activent cette oxydation; sans doute les caroténoïdes fonctionnent-ils comme transporteurs d'oxygène. (H.-S. OLCOTT, 59.)

(56) B.M. GALLAGHER - Bioch. J. 1923 - 17 - 515.

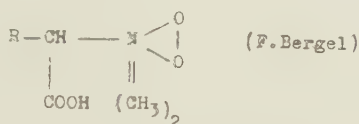
(57) T. ARAKAWA et SATO - Tohoku, Journ. of. exp. Med. 1927 - 9 - 646.

(58) G.W. ELLIS Bioch. J. 1932 - 26 - 791 ; HINBERG G. HOLLAND, Zs exp. med. 94 - 471, 1934.

(59) H.S. OLCOTT J. Amer. Chim. Soc. 1934 - 56 - 2432 ; W. FRANKE. Ann. Chim. Pharm. 1932 - 498 - 129.

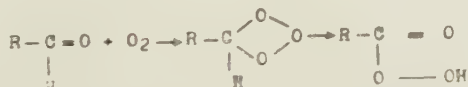
Les caroténoïdes pouvant être associés au glutathion (JOYET-LAVERGNE), doivent jouer le rôle de transporteurs d'oxygène et l'hémine catalyserait la transformation du peroxyde d'addition conformément à la réaction ci-dessus écrite.

Signalons également la catalyse oxydative des acides aminés par le charbon qui est interprété par WARBURG par la formation préliminaire d'un peroxyde d'azote du type



M.-A. KREBS (61) considère que l'élaboration de ce dérivé est le premier stade de l'action de l'aminodéshydrase.

Enfin l'autooxydation des aldéhydes en peracides est un exemple classique de la formation de peroxydes intermédiaires. Elle se produit en milieu anhydre (WIELAND).



Il est possible également que la combinaison du peroxyde d'hydrogène avec la fonction aldéhydique (WIELAND et WINGLER) joue un rôle important dans le métabolisme intermédiaire.

Cette rapide revue générale met en évidence combien le rôle des peroxydases en biologie peut être important. Il est impossible de considérer ces enzymes comme accessoires et de limiter leur action à l'éloignement de l'eau oxygénée, substance toxique et nuisible. Même sur le plan thermodynamique l'utilisation de ce peroxyde est importante, car l'hydrogénation de O_2 par H_2 ne libère que 1/4 de l'énergie, les 3/4 étant libérés par l'hydrogénation de H_2O_2 .

(60) BERGEL - Zs. phys. chim. **215** - 24 ; **220** - 20 ; **233** - 66.

(61) H.A. KREBS - Ann. rev. of bioch. **1956** - **5** - 247.

La répartition générale de ces catalyseurs, leur spécialisation, leur très grande activité, la production du peroxyde dans les tissus animaux et végétaux sont autant de preuves à donner à l'importance de leur rôle biologique. La découverte des déshydrases a totalement déplacé l'axe d'intérêt des systèmes d'oxydo réduction autour duquel les auteurs modernes font graviter tous les catalyseurs d'oxydation. A l'encontre des faits expérimentaux les mieux vérifiés, la théorie de la deshydrogénation a englobé les peroxydases par l'unification de tous les mécanismes enzymatiques, ce qui correspond davantage à une satisfaction de l'esprit qu'à une interprétation logique des résultats. Progressivement les vieilles théories de BACH et ENGLER modifiées à la lumière des faits nouveaux, reprendront une place restreinte, mais réelle dans le cadre de l'oxydation biologique.

La faible contribution que nous avons apporté à ce point de vue a trait à l'étude de l'action peroxydasique de l'hémoglobine, recherche que nous avons menée sous la conduite de M. POLONOVSKI et M.-F. JAYLE. Nous nous sommes particulièrement attachés à la destruction de ce chromoprotéide dont la fragilité est la raison essentielle pour laquelle trop longtemps, le pigment sanguin a été rayé du cadre des catalyseurs biologiques. Nous avons en particulier considéré l'influence de tous les facteurs (*pH, température, concentration des substrats, nature des substrats, haptoglobine*) susceptibles d'influencer la cinétique de son action peroxydasique et nous avons intégré nos résultats à l'intérieur du cadre tracé par les auteurs qui ont étudié cette même question.

CHAPITRE PREMIER

Nous exposerons dans ce premier chapitre les techniques de préparation de l'hémoglobine cristallisée et des peroxydes, ainsi que les méthodes de dosage de l'activité peroxydasique du pigment sanguin employées jusqu'à nous ou par nous-mêmes.

Les déterminations quantitatives de l'action catalytique du pigment sanguin étaient toutes basées sur l'activation de l'eau oxygénée, avant que M. POLONOVSKI et M.-F. JAYLE aient mis en évidence la spécificité relative de l'hémoglobine à l'égard des hydroperoxydes d'alcoyle. Cette constatation est la raison pour laquelle ils substituent dans leur méthode de mesure, l'hydroperoxyde d'éthyle à l'eau oxygénée. Cette technique devient spécifique quand elle est appliquée à l'hydroalcoyloperoxydase mis en évidence par ces auteurs dans le plasma sanguin.

I. — PREPARATION DES PEROXYDES

Pour préparer les peroxydes on utilise :

- 1° l'eau oxygénée;
- 2° le bioxyde de baryum;
- 3° l'hydrate de bioxyde de sodium;
- 4° l'acide de Caro;
- 5° l'ozone;
- 6° la coupure de certains ozonides.

On obtient les dérivés mono et dialcoylés de l'eau oxygénée en substituant les atomes d'hydrogène au moyen du

sulfate de méthyle ou du sulfate d'éthyle en milieu fortement alcalin; nous décrirons successivement :

- a) la préparation de l'hydroperoxyde de méthyle;
- b) — — — — — d'éthyle;
- c) — — — — — du peroxyde d'éthyle;
- d) — — — — — de l'acide péracétique;
- e) — — — — — du monoperoxyde de l'aldéhyde éthylique.

a) *Préparation de l'hydroperoxyde de méthyle* (A. RICHE, 62). — Dans un ballon muni d'un agitateur mécanique on introduit 150 cm³ d'eau oxygénée à 30 %, 250 cm³ d'eau et 100 gr. de sulfate de méthyle. On laisse tomber régulièrement 210 gr. de lessive de OHK (85 gr. OHK dans 125 gr. eau) en refroidissant le ballon de façon à maintenir la température entre 8 et 10°; la grande partie du peroxyde se décompose sous l'influence de l'alcali. Il se forme également un peu de peroxyde de méthyle qui s'échappe sous forme de gaz. Il faut opérer loin de toute flamme. On acidifie au moyen de l'acide sulfurique à 50 % en refroidissant soigneusement avec de la glace; on note un fort dégagement gazeux. On distille assez rapidement sur un bain d'huile jusqu'à réduction du volume à moitié. Le distillat est traité environ 20 fois par de l'éther ou mieux épuisé dans un appareil à extraction continue. La solution étherée est alors séchée sur du sulfate de sodium anhydre et après filtration évaporée au B.M. jusqu'à ce qu'il ne reste qu'une très petite quantité d'éther.

On obtient environ 20 gr. de produit brut que l'on fractionne sous pression réduite, au bain-marie à 60° environ; la fraction principale passe entre 38° et 40° à 65 mm; les produits de tête et de queue sont soumis à un nouveau fractionnement, ce qui donne, au minimum, 7 gr. d'hydroperoxyde de méthyle purifié.

b) *Préparation de C₂H₅OOH*. — Dans un récipient refroidi par un courant d'eau et muni d'un dispositif d'agitation continue, on laisse tomber goutte à goutte pendant 5 heures, 200 gr. d'une solution de potasse à 40 % dans 370 gr. de H₂O₂ à 10 % et 100 gr. de sulfate d'éthyle. La solution est

(62) A. RICHE - Ber. d. chem. Ges. 1929 - 62 - 2469.

agitée encore pendant une heure, acidifiée légèrement dans la glace et distillée sur un bain d'huile jusqu'à l'obtention d'un tiers de son volume; l'hydroperoxyde impure passe entre 90 et 100°. Il entraîne de l'alcool, de l'eau et des traces d'acide acétique. On distille ensuite sous pression réduite à 30 ou 35 mm le rendement est de 50 %. La préparation est alcalinisée et distillée sous pression réduite dans un ballon à col court muni d'un tube capillaire et d'un long tube se terminant réfrigérant. En peu de temps on peut ainsi réduire le volume au 1/4 et limiter la destruction du peroxyde. Cette opération a permis l'élimination de l'alcool alors que le peroxyde est retenu dans le ballon grâce à ses propriétés légèrement acides. On acidifie avec de l'acide sulfurique à 50 % et on distille au bain d'huile : la fraction riche en peroxyde passe à 95°. La distillation est arrêtée quand la température atteint 97°, ce qui fournit une concentration de l'ordre de 40 % en peroxyde. Pour l'obtention du peroxyde à l'état pur, on sature le distillat avec du sulfate d'ammonium et le peroxyde se sépare sous forme d'une couche huileuse surnageante. Celle-ci est reprise par l'éther et fractionnée à plusieurs reprises sous pression réduite. On ne peut éliminer complètement l'eau par SO_4Na_2 anhydre ni utiliser dans ce but le carbonate de potassium ou le chlorure de chaux, car ces corps se dissolvent en grande partie dans le peroxyde.

c) *Préparation du peroxyde d'éthyle - $\text{C}_2\text{H}_5 - \text{OO} - \text{C}_2\text{H}_5$.* — A un mélange 210 gr. de sulfate d'éthyle et 150 gr. H_2O_2 à 12 % on ajoute goutte à goutte pendant 10 heures 360 gr. de potasse à 50 %, en maintenant la température à 15° et en agitant. La solution huileuse qui passe à 70° est séparée, distillée sur un bain d'huile et recueillie dans un récipient réfrigéré; la portion passe jusqu'à 70°.

Le produit brut (40 cm³ environ), lavé avec de la lessive de soude et plusieurs fois avec de l'eau, est séché sur du sulfate de soude. Par fractionnement renouvelé, on obtient une fraction passant rapidement. Celle-ci est encore fractionnée sur sulfate de sodium et représente environ 3 gr.

Son point d'ébullition se situe entre 60° et 63°.

d) *Préparation de l'acide peracétique.* (J. D'ANS, W. FREY.) — On mélange goutte à goutte, et en refroidissant avec de

l'eau glacée, une mol. de H_2O_2 à une mol. d'anhydride acétique selon la réaction (63) :



On ajoute 2 à 3 % d'acide sulfurique et ensuite on introduit la 2^e molécule de H_2O_2 . On laisse reposer la solution pendant 12 heures à la température ambiante (entre 15° et 18°). L'acide sulfurique sert de catalyseur à la réaction, et si on en ajoute une quantité suffisante, l'équilibre se déplace en faveur du peracide. La distillation du produit entre 20 et 30° à 12 mm fournit des solutions ayant une teneur en moyenne de 78 % en acide peracétique. Par congélation et centrifugation on obtient un produit complètement pur.

On utilise en général 100 gr. d'anhydride acétique, 69 gr. de H_2O_2 pure et 22.35 d'acide sulfurique. 147 gr. du produit distillé contiennent 129 gr. de peracide et 0 gr. 50 de H_2O_2 . Dans le résidu de distillation il reste toujours à côté de l'eau oxygénée non modifiée un peu de peracide.

e) *Préparation du mono-peroxyde de l'aldéhyde éthylique.* — On fait passer pendant plusieurs heures un courant d'ozone dans de l'aldéhyde éthylique. On alcalinise la solution et on distille sous pression réduite. Le peroxyde est retenu grâce à ses propriétés acides. Il est ensuite distillé après neutralisation en présence de tournesol. [HARRIES et LANGHELD (64).]

II. — DOSAGE DE L'OXYGENE ACTIF TOTAL D'UN PEROXYDE OU D'UNE SOLUTION DE PEROXYDE

La méthode la plus fréquemment employée pour le dosage de l'oxygène actif est le titrage, par l'hyposulfite, de l'iode de libéré par oxydation de l'iodure de potassium par le peroxyde en solution acide.

(63) J. D'ANS et W. FREY - Ber. d. chem. Ges. 1912 - 2 - 1845.

(64) HARRIES et LANGHELD Lieb. A 1905 - 343 - 345.

D'après CLOVER et RICHEMOND (65), l'oxydation de l'acide iodhydrique n'est réalisée que par les peroxydes ayant un atome d'hydrogène libre. Dans tous les autres cas, la libération de l'iode est précédée d'une coupure donnant des dérivés monosubstitués.

La solution est abandonnée à elle-même jusqu'à destruction totale du peroxyde.

Les peroxydes difficilement solubles dans l'eau réagissent difficilement avec l'iodure, mais ils n'intéressent pas notre travail. Au contraire les peracides oxydent l'iodure instantanément. CLOVER et HOUGHTON (66) déterminent le titre des peracides dans une solution contenant plusieurs peroxydes en dosant pendant les 30 premières secondes, l'iode libéré qui répond à cette substance.

Nous avons employé pour le dosage des peroxydes la technique suivante :

On introduit dans une capsule 1 cm³ de peroxyde, 4 cm³ d'eau distillée, 5 cm³ IK à 10 %, 2 cm³ SO⁴H² à 25 % et trois gouttes d'une solution saturée d'acide molybdique — l'iode libéré est dosé après 3 heures par l'hyposulfite de sodium

$\frac{n}{10}$ —. La solution est ramenée par dilution au titre $\frac{n}{10}$, qui

est vérifié par un dosage de contrôle. Par ce dosage on ne titre pas complètement l'oxygène actif, mais le pourcentage d'erreur reste toujours constant. Il est préférable de faire un témoin sans peroxyde pour la correction de l'oxydation spontanée de IH en milieu acide.

En raison de la décomposition complexe des hydroperoxydes il est impossible d'exprimer en milligrammes la totalité du peroxyde contenu dans la solution, mais seulement celle qui intéresse l'oxydation de l'acide iodhydrique. A. RICHE et F. HIRTZ (10) ont en effet établi que l'acide iodhydrique ne conduit pas quantitativement à l'alcool correspondant.

Le comportement de l'hydroperoxyde de méthyle est particulièrement intéressant, car cette substance agit à la fois

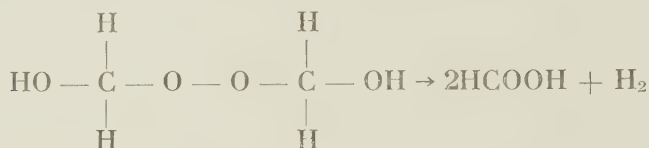
(65) CLOVER et RICHEMOND Amer. 1903 - 29 - 182.

(66) CLOVER et HOUGHTON Amer. J. 1904 - 32 - 55.

comme accepteur et donneur d'hydrogène. C'est ainsi qu'en solution alcaline à 70° il se décompose suivant la double réaction



D'après WIELAND et WINGLER, il s'agirait de la destruction d'un peroxyde de dioxyméthyle intermédiaire.



Mais RIECHE pense qu'il s'agit d'un composé intermédiaire analogue à celui que donne la combinaison de l'eau oxygénée avec l'aldéhyde formique et correspondant ici au monooxydiméthylperoxyde $\text{CH}_3 - \text{O} - \text{O} - \text{CH}_2\text{OH}$ et il donne comme argument le fait que la libération d'hydrogène est considérablement accélérée par addition d'aldéhyde.

En outre il se produirait une hydrolyse de ce produit avec libération d'acide formique :



et RIECHE représente ainsi la décomposition complexe de l'hydroperoxyde de méthyle :

- A. $2 \text{CH}_3\text{OOH} \rightarrow 2 \text{HCHO} + 2 \text{H}_2\text{O}$
- B. $2 \text{CH}_3\text{OOH} + 2 \text{HCHO} \rightarrow 2 \text{CH}_3 - \text{O} - \text{O} - \text{CH}_2\text{OH} + \text{CH}_3\text{OOH}$
- C. $2 \text{CH}_3\text{OOCH}_2\text{OH} \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{O}^- + 2 \text{HCOOH} + \text{H}_2$
- D. $2 \text{CH}_3\text{O}^- \rightarrow \text{CH}_3\text{OH} + \text{HCHO}$

De cette chaîne de réactions retenons trois faits essentiels : la libération d'aldéhyde, d'hydrogène et du radical méthoxyle, par analogie à celle du radical oxhydriyle qui, comme nous l'avons vu, joue un rôle si important dans l'explication du mécanisme de la catalyse minérale des réactions de peroxydation.

On peut mettre en évidence le pouvoir réducteur de l'hydro-

peroxyde de méthyle par la décoloration du bleu de méthylène en leucodérivé.

La libération d'hydrogène par l'hydroperoxyde d'éthyle en milieu alcalin est très faible mais elle devient notable, par addition d'aldéhyde éthylique. Là encore la libération du radical éthoxyle est un stade important de la chaîne des réactions de décomposition.

Pour exprimer en milligrammes la concentration du peroxyde dans la solution on peut faire appel à sa transformation en acide acétique par la méthode sulfochromique.

Signalons enfin les méthodes de dosages des peroxydes basées :

a) sur l'oxydation du chlorure stanneux en atmosphère de gaz carbonique. [PECHMANN et VANINO (67).]

b) sur la réduction du peroxyde par l'hydrogène naissant. [V. BAEYER et VILLIGER (68).]

c) par oxydation de l'indigosulfonate de sodium en isatine incolore. [ENGLER et WEISSBERG (69).]

III. — PREPARATION DE L'OXYHEMOGLOBINE CRISTALLISEE

Le sang frais oxalaté de cheval est centrifugé et les globules séparés sont lavés quatre fois avec une solution de CINa à 9 pour 1000. 300 cm^3 de globules ainsi obtenus sont refroidis et laqués avec 90 cm^3 d'eau distillée et 90 cm^3 d'éther (ou 60 cm^3 de toluène). Le mélange est vigoureusement agité pendant 5 minutes et centrifugé. A l'aide d'une pipette on prélève la couche inférieure que l'on introduit dans un becher plongeant dans un mélange réfrigérant (3 partie de la glace pour une de sel marin = -5°). On verse goutte à goutte dans la solution de l'alcool à 95° jusqu'à une concentration de 20 %. On abandonne dans une glacière vers -5° . Après deux à trois heures les cristaux formés sont essorés,

(67) PECHMANN et VANINO - Ber. d. chem. Ges. 1884 - 27 - 1510.

(68) V. BAEYER et VILLIGER - Ber. d. chem. Ges. 1900 - 33 - 3390.

(69) ENGLER et WEISSBERG, 1904. Über die Vorgänge der autooxydation.

lavés avec de l'alcool à 20 % également refroidi, et repris par le minimum d'eau à 39° en ajoutant 10 cm³ de soude

N
— pour 100 cm³ de solution. Après dissolution on neutralise
10 N
exactement par C/H —; on centrifuge et on laisse la solu-
10

tion toute la nuit à la glacière. On peut procéder à plusieurs recristallisations. L'oxyhémoglobine cristallisée est conservée à basse température.

2. — Méthode de SIDWELLE et HOGESSE.

Ces auteurs substituent le toluène à l'éther. La solution, après séparation de toluène, est dialysée pendant 48 heures sur cellophane contre de l'eau distillée, saturée en oxygène. Ils centrifugent et filtrent sur un filtre de verre type *g* (5/3). Ils estiment en effet que l'alcool altère l'hémoglobine et changent ses propriétés optiques. Cependant l'action peroxydase de l'hémoglobine ne change pas si l'on a soin d'essorer au bout de 3 heures en solution alcoolique, de façon à éviter un contact prolongé de l'hémoglobine avec l'alcool, et si on lave rapidement les cristaux obtenus avec de l'eau glacée.

Nous avons, en général, employé la première méthode en remplaçant l'éther par le toluène.

IV. — PREPARATION DE LA MYOHEMOGLOBINE

THEORELL a établi entre 1932 et 1934 les caractéristiques de l'hémoglobine musculaire.

1° *Préparation.* — En 1935, WATSON (70) précisa les conditions d'une extraction complète de l'hémoglobine musculaire. Il procéda ainsi :

5 à 6 gr. de tissu musculaire coupé en tranches minces sont broyés avec un volume égal de sable. La masse bien broyée est lavée dans un tube à centrifuger de 25 cm³ avec une solution tamponnée de phosphate M/15 à pH de 6,5 environ. On

(70) R.H. WATSON, - Biochem. J., 1935 - 29 - 2114-2121.

utilise 14 cm³ de la solution de phosphate et on agite doucement pendant 3 heures. On centrifuge alors pendant 5 minutes à 3.000 tours à la minute. Le liquide surnageant est décanté, abandonné à la glacière. Une nouvelle extraction est pratiquée dans les mêmes conditions; une troisième enfin et les extraits sont mélangés, centrifugés pendant 45 minutes; le liquide surnageant est décanté, agité avec de l'hydrate de silice (colloïdale) et filtré par aspiration trois fois de suite après quoi il est parfaitement clair.

L'élution est réalisée par quelques cm³ d'ammoniaque à 0,1 %. Le liquide ainsi obtenu contient l'hémoglobine musculaire. Sa quantité peut être estimée par la méthode spectrophotométrique.

Des chiffres indiquant la concentration de l'hémoglobine musculaire dans le muscle avait été donné par RANDON. L'extraction de cet auteur avait été faite au moyen de l'eau. D'autres chiffres furent donnés par WHIPPLE après extraction par l'ammoniaque. D'après les calculs de WATSON il semble que sa méthode, plus sélective, donne des chiffres inférieurs de 30 % environ à ceux obtenus par la méthode de WHIPPLE.

D'après les observations de RANDON, la concentration en hémoglobine musculaire représente pour le muscle cardiaque, suivant l'espèce, une proportion de 45 à 76 % de l'hémoglobine totale.

Propriétés. — La bande d'absorption « a » de l'hémoglobine musculaire est différente de celle de l'hémoglobine du sang. La position étant pour le sang de 5.765 Å et pour le muscle de 5.800 Å, RANDON note d'ailleurs des variations légères d'une espèce à l'autre.

V. — DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE

Trois types de dosages peuvent être envisagés. Les méthodes physiques (colorimétrique et spectrophotométrique), les méthodes gazométriques, les méthodes chimiques basées sur le dosage du fer.

Les dosages que nous avons utilisés rentrent dans ce dernier type. On sait en effet que la proportion de fer trouvée à l'analyse de l'hémoglobine d'une espèce animale donnée est

constante. La détermination du poids de l'hémoglobine par dosage du fer nécessite évidemment la connaissance du pourcentage F du fer dans l'hémoglobine considérée. Ces pourcentages F ont été établis depuis longtemps avec une grande précision pour la plupart des espèces de l'hémoglobine et nous avons rappelé ci-dessous la plupart de ceux qui sont couramment admis.

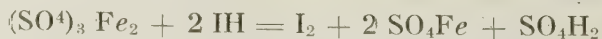
Espèce animale	F Pourcentage du fer dans l'hémoglobine
Espèce humaine	0,42 à 0,43 %
Cheval	0,36
Bœuf	0,40
Porc	0,43
Chien	0,34
Chat	0,35
Cobaye	0,48
Souris	0,49
Coq	0,34

Ce qui importe de connaître, pour des réactions catalytiques, ce n'est pas tant la quantité d'hémoglobine exprimée en milligrammes que la concentration moléculaire du pigment. Pour simplifier son expression, nous ne tenons pas compte de la polymérisation de l'hémoglobine dont on sait à l'heure actuelle qu'une molécule renferme plusieurs atomes de fer, et nous simplifions en supposant qu'une molécule catalytiquement activée renferme un seul atome de fer.

A. - MÉTHODE VOLUMÉTRIQUE

La méthode de MOREAU est une simple adaptation de la manganimétrie. Celle de KNECHT réside dans la réduction du chlorure titaneux; enfin celle de DE FONTES et THIVOLLE est une application de la molybdomanganimétrie.

Mais nous avons utilisé surtout la méthode iodométrique basée sur l'oxydation de l'acide iodhydrique par l'ion ferrique, selon la réaction :



L'iode libéré est titré par l'hyposulfite N/200 dont 1 cm³ cor-

respond à 0,279 mg. du fer (1 cc. hyp. N/100 à 0,558 mg. du fer). Un titrage à blanc permet d'éviter les erreurs dues aux impuretés des réactifs. Pour tous détails voir la thèse de médecine de M.-F. JAYLE, Paris 1939.

Le dosage colorimétrique du fer par la méthode de WONG perfectionnée par J. FOURCADE (71)

On sépare le fer de la molécule d'hémoglobine par l'action de l'acide sulfurique concentré qui agit par une action hydrolytique utilisée dans la préparation de l'hématoporphyrine acide. La décomposition est facilitée par addition de persulfate de potassium. On fait une défécation à l'aide de l'acide phosphotungstique. Dans le filtrat on transforme le fer en sulfocyanure ferrique que l'on dose colorimétriquement.

Réactifs et solutions titrées utilisés

1° L'acide sulfurique type Congrès 1922 à 65°,5 BEAUMÉ.

2° Une solution de persulfate d'ammonium pur pour analyse à 2 gr. 5 pour cent cm³, solution dont l'action équivaut sensiblement à celle de la solution saturée de persulfate de potassium.

3° Une solution aqueuse de phosphotungstate de sodium à 15 gr. pour 100 cm³.

4° Une solution aqueuse de 500 gr. de sulfocyanure d'ammonium et 40 cm³ d'acétone pure pour 1.000 cm³. Solution qui correspond pratiquement à celle de sulfocyanure de potassium et d'acétone de WONG.

Tous ces réactifs sont vérifiés exempts de fer.

5° Enfin une solution aqueuse titrée de 0 gr. 863 d'alun de fer et d'ammonium cristallisé et 2 cm³ d'acide sulfurique pour 1.000 cm³ (solution ETALON).

Pratique. — Mettre, dans un large tube en pyrex, exactement 0 cm³, 5 de sang étudié, puis 2 cm³, 5 d'acide sulfu-

(71) FOURCADE - Thèse de Doct. en pharmacie 1936. Montpellier.

rique; mélanger avec un agitateur, tout en chauffant légèrement, de façon à transformer complètement le magma produit en un liquide homogène; ajouter ensuite 2 cm³ de la solution de persulfate d'ammonium; agiter, refroidir sous un courant d'eau froide et transvaser quantitativement dans un ballon jaugé de 50 cm³ bouché à l'émeri dans lequel on introduit les eaux de lavages qui portent le volume du liquide à 15 cm³ environ. Introduire alors dans le ballon 2 cm³ de réactif phosphotungstique, agiter et refroidir à la température ambiante. Ceci fait, compléter exactement à 50 cm³ avec de l'eau bidistillée après avoir, s'il y a lieu, détruit la mousse par addition de quelques gouttes d'alcool à 95°. Boucher, agiter, puis verser 35 à 40 cm³ du mélange dans un grand tube à centrifugation (tube à centrifugation en pyrex de 45 cm³ par exemple) et centrifuger deux minutes à 2.000 tours. Enfin pipeter exactement dans un bécher 20 cm³ du liquide surnageant puis 1 cm³ de la solution de persulfate et 4 cm³ de la solution de sulfocyanure en mélangeant avec un agitateur. La solution est prête pour le dosage colorimétrique. D'autre part, dans un ballon jaugé de 25 cm³ bouchant à l'émeri, introduire 1 cm³, exactement mesuré de la solution étalon et 1 cm³ d'acide sulfurique; diluer à environ 17 cm³ avec de l'eau distillée. Ajouter 1 cm³, 8 de la solution de persulfate et 4 cm³ de la solution de sulfocyanure. Compléter exactement à 25° avec de l'eau distillée, boucher et mélanger; enfin comparer au colorimètre de Dubosq.

Les 20 cm³ de filtrat représentent 0 cm³, 2 du sang initial et la quantité de solution étalon employée contenant 0 mg 1 de fer; le résultat cherché, exprimé en fer, sera :

$$X Fe = \frac{he}{hx} \times 50 \quad (I)$$

X Fe représente le nombre de milligrammes de fer dans 100 cm³ du sang étudié, (*he*) la hauteur de la colonne correspondant à la solution étalon et *hx* celle correspondant à celle du dosage.

Il est logique de transformer les taux de fer X Fe donnés par l'équation (I) en taux d'hémoglobine X Hb. Naturellement ceci ne peut être fait que quand on connaît exactement le pourcentage (F) de fer dans l'hémoglobine de l'espèce animal

dont le sang est étudié, mais nous savons que cette condition est presque toujours remplie. Le passage au taux d'hémoglobine est donc généralement possible; on le réalise en utilisant l'équation :

$$X \text{ Hb} = \frac{X \text{ Fe}}{10 f} \quad (\text{II})$$

qui donne les taux $X \text{ Hb}$ exprimés en grammes de Hb pour 100 cm^3 de sang.

Nous ramenons par le calcul cette concentration à 1.000 cm^3 de la solution de globules ou d'hémoglobine. Soit y , cette quantité exprimée en grammes. Pour traduire ce chiffre en concentration moléculaire par rapport à une molécule d'hémoglobine (1), il suffit d'effectuer une simple règle de trois. $55,8 \text{ gr.}$ de Fe correspond à une sol. d'hémoglobine $\text{M}/1$

1 gr.	—	—	$\text{M}/55,8$
$y \text{ gr.}$	—	—	$\text{M} \times y/55,8.$

On dilue ensuite la solution au titre choisi.

VI. — REACTIONS PEROXYDASIQUES

MISES EN EVIDENCE ET METHODES DE MESURE

A. - RÉACTIONS QUALITATIVES

Les réactions peroxydasiques se produisent quand les 3 substances du système ternaire peroxyde-enzyme-substrat se trouvent réunies. Le peroxyde employé est en règle générale l'eau oxygénée, et les substrats les plus classiques sont la teinture de gaïac et la benzidine, dont le mode de préparation est le suivant :

a) Teinture de gaïac. — On broie dans un mortier la résine de gaïac réduite en poudre avec de l'alcool ajouté peu à peu (50 cm^3 environ). On ajoute l'acide acétique, l'acétate de sodium, la solution d'acide arsénieux et on complète à

(1) On admet ici pour simplifier qu'un atome de Fe correspond à une molécule de HGO_2 .

100 cm³. On peut tamponner le milieu à pH 5, d'après la formule d'ARAKAWA (72).

Résine de gaïac	0,3 à 1
Acide arsénieux	0,02
Acide acétique glacial	0,6
Acétate de Na (3 H ¹ O)	1,36
Alcool 99 % q.s.	100 cm.

b) Solution de benzidine d'après ARAKAWA : on ajoute 20 à 30 cm³ de toluène à 10 gr. de benzidine en agitant. On décante le toluène coloré et on répète la même opération jusqu'à ce que la solution décantée soit incolore. On filtre et on dessèche la substance dans un dessiccateur dans l'obscurité. On dissout 1 gr. de benzidine dans 10 cm³ d'acide acétique et on complète à 50 cm³ avec de l'eau distillée.

Pour la recherche de l'hémoglobine la réaction de MEYER s'avère d'une grande sensibilité.

Préparation du réactif de KASTLE MEYER.

Porter à une douce ébullition dans un vase d'ERLENMEYER un mélange de 2 gr. de phtaléine du phénol et 10 gr. de poudre de zinc, avec une solution alcaline (40 cm³ de lessive de soude dans 60 cm³ d'eau). Lorsque la décoloration est complète, on filtre le liquide bouillant et on recueille dans un flacon renfermant des lamelles de zinc.

Dans un tube à essai, on verse quelques cm³ de la solution à essayer, quelques gouttes d'un des réactifs ci-dessus mentionnés. 2 à 5 gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes. Il se produit une coloration bleue dans les deux premiers cas et rouge dans le troisième. Les réactions qualitatives ont le gros défaut d'être trop générales et de s'étendre à la catalyse minérale. Elles sont instantanées et la coloration atteint son maximum au bout de quelques secondes.

En raison de leur absence de spécificité à l'égard des catalyseurs biologiques, elles devraient être dénommées : réactions qualitatives de peroxydation, car elles mettent en évidence le premier stade d'activation de l'oxygène peroxydique (page 29).

Les trois exemples ci-dessus cités montrent combien varié est le substrat réducteur utilisé, et il ressort de la liste des

(72) T. ARAKAWA - Tohoku journ. of exp. Méd. 1930 - 16 - 83, 90.

principaux corps qui se prêtent à cette réaction (voir page 6) que l'on ne saurait mettre en évidence un groupement particulier dans leur représentation formulaire. Ajoutons cependant que le choix du substrat n'est pas complètement indépendant de celui du peroxyde et de l'enzyme. Nous avons vu, au cours de la revue générale présentée dans l'introduction de ce travail (page 31) que les substances organiques pouvaient être oxydées par certains systèmes de peroxydation biologique et que les peroxydes de dialcoyle, s'ils ne donnaient pas les principales réactions de coloration classiques, étaient susceptibles par contre de réagir avec certains corps oxydables. Enfin l'acide ascorbique substrat dans le cas de l'hémoglobine ne l'est pas dans celui des peroxydases végétales.

B. - DOSAGE QUANTITATIF DE L'ACTIVITÉ PEROXYDASIQUE

De nombreuses méthodes ont été proposées et sont basées :
— sur un dosage colorimétrique (oxydation du pyrogallol du gaïacol ou d'un leucodérivé d'une matière colorante (vert de malachite par exemple),

— sur une mesure spectrographique de la matière colorante oxydée ou encore sur une détermination potentiométrique : c'est ainsi que M.-V. SITHARAMAN et S. RENGACHARI (73) étudient l'oxydation de l'hydroquinone en présence d'un excès de quinhydrone. La méthode volumétrique à l'iodure de potassium est une des plus simples et des plus précises. C'est pourquoi nous l'avons utilisé de préférence aux autres. Avant d'aborder les modalités qu'elle présente selon la technique employée, nous donnerons une description sommaire des principales mesures classiques :

1^o Méthode de WILLSTAETTER et STOLL (74).

Dans deux litres d'eau à 20°, introduits dans un ballon plongé dans un bain à température constante, on dissout

(73) M.V. SITHARAMAN et S. RENGACHARI. S. Indian Chim. Soc. 1937 - 14 - 278.

(74) R. WILLSTAETTER A. STOLL. Uber peroxydase. Annalen d. chem. 1918 - 416 - 21-64.

5 gr. de pyrogallol. On ajoute 10 cm³ de H₂O₂ à 5 pour cent, contenant exactement 50 mg de H₂O₂, et la peroxydase (0,25 mg d'une préparation moyenne par exemple ou 0,02 mg d'une poudre active sous forme de 1 à 5 cm³ d'une solution de 5 mg d'enzyme dans 100 à 500 cm³ d'eau). La solution jaunit aussitôt : au bout de 5 minutes, la réaction est arrêtée par addition de 50 cm³ de SO₄H₂ à 10 %. On épuise la purpuragalline 3 à 4 fois avec de l'éther et on effectue le dosage colorimétrique par comparaison avec une solution étalon contenant dans 1 litre d'éther 100 mg de purpurogalline recristallisée à partir d'un mélange alcool-éther. La quantité de purpurogalline formée est proportionnelle à la quantité d'enzyme. La quantité de catalyseur utilisée est telle que 15 à 25 mg de purpurogalline soient obtenus au bout de 5 minutes. L'activité est évaluée en P.Z. (Purpurogallin-Zahl) qui est la quantité de purpurogalline formée en 5 minutes par un mg de l'enzyme.

Beaucoup d'auteurs utilisent des fractions des quantités ci-dessus indiquées, soit par exemple : 400 cm³ d'eau, 1 gr. de pyrogallol et 10 mg de H₂O₂. BANSI et UCKO (1) se servent comme étalon colorimétrique, d'une solution d'acide chromique à 0,57 pour 1.000 qui correspond à une solution de purpurogalline de 0,1 pour 1.000.

2° Méthode de BACH modifiée par BANSI et UCKO (75).

Elle est basée sur l'oxydation du gaïacol en tétragaïaquinone (G. BERTRAND). Ce substrat a sur le précédent l'avantage considérable d'être soluble dans l'eau à l'état oxydé et de ne pas être autooxydable sous forme réduite. BANSI et UCKO ont modifié la méthode de BACH afin de se placer dans les conditions expérimentales de la méthode de WILLSTAETTER.

5 cm³ de gaïacol à 1 % sont ajoutés à 400 cm³ d'eau à 20°. On introduit 1 cm³ de H₂O₂ à 1 % et la solution de l'enzyme. La réaction est arrêtée au bout de 5 minutes, par addition de 10 cm³ de sublimé à 5 % à 20 cm³ de la solution prélevés à la pipette. La mesure colorimétrique doit être faite dans le quart d'heure qui suit, afin d'éviter le virage de la teinte. Le

(75) H.W BANSI et H. UCKO. Zs. für physiol. Chim. 1926 - 152 - 235.

test colorimétrique est une solution de nitrate de cobalt à 10 %, à 50 cm³ de laquelle on ajoute 1,2 cm³ de bichromate de potassium à 5 %. On dilue cette solution au 1/10° (A), au 1/5° (B) ou au 1/2, 5° (C) et l'égalisation des teintes est faite en fixant la hauteur du témoin à la graduation 10 du colorimètre de Duboscq. La quantité de gaïacol est donnée par les courbes empruntées au travail de BANSI et UCKO (12c), (Fig. 1, 2, 3) qui donnent en mg la quantité de gaïacol en fonction de la hauteur de la solution à doser, après égalisation des teintes au colorimètre de Duboscq, selon que l'on emploie la solution témoin A, B, C (fig. 8, 9, 10). Quand l'enzyme utilisé

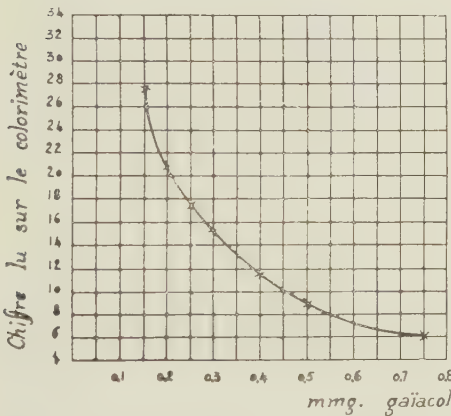


FIG. 8.

Quantité de gaïacol oxydé en mg. en fonction de la lecture au colorimètre Duboscq (solution étalon A).

(D'après H. W. BANSI et H. UCKO).

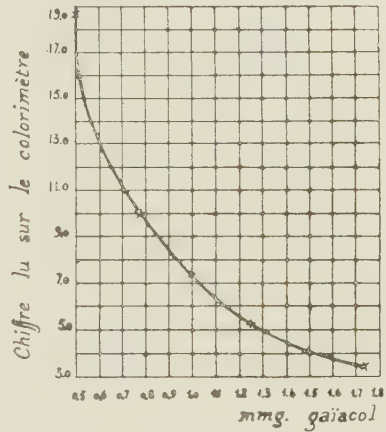


FIG. 9.

Quantité de gaïacol oxydé en mg. en fonction de la lecture au colorimètre Duboscq (solution étalon B).

(D'après H. W. BANSI et H. UCKO).

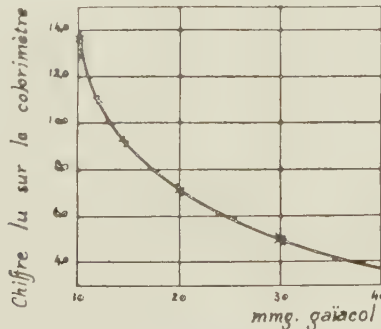


FIGURE 10.

Quantité de gaïacol oxydé en mg. en fonction de la lecture au colorimètre Duboscq (solution étalon C).

(D'après H. W. BANSI et H. UCKO).

est l'hémoglobine, la mesure colorimétrique est rendue plus difficile par la formation des dérivés d'oxydation du pigment sanguin qui présente une coloration propre. WILLSTAETTER et STOLL préparaient une solution témoin à laquelle ils ajoutaient les substances résultant de l'action oxydative de l'eau oxygénée sur la quantité employée du pigment sanguin.

Citons, encore, avant d'aborder la réaction iodométrique une technique fort employée qui est celle de l'oxydation du leucovert malachite. Nous reportons pour son étude détaillée au traité de WILLSTAETTER (76).

Elle présente l'avantage d'être d'une grande sensibilité et on y a fait souvent appel pour la détermination des courbes d'activités enzymatiques. Elle présente à notre avis deux gros défauts : l'un dû à la faible solubilité de substrat, l'autre à l'obligation, qu'entraîne sa dissolution dans l'acide acétique, de l'utiliser dans une zone de pH très acide.

3° Méthodes iodométriques.

a) Méthode indirecte de dosage de l'iode libéré par un système peroxyde-peroxydase - IH. [M.-F. JAYLE (48).]

On introduit dans une capsule plongeant dans un bain à 23° ($\approx 1^{\circ}$) et muni d'un système d'agitation mécanique (fig. 11). $0,2 \text{ cm}^3$ de la solution de peroxydase, 3 cm^3 IK M/10 $0,5 \text{ cm}^3$ d'acide ascorbique N/10 dosé par une solution d'iode N/10. Dans un tube à essai, on met 10 cm^3 d'une solution de citrate M/20 au pH optimum du système, 1 cm^3 de peroxyde N/10 et 3 gouttes d'empois d'amidon, le tout à la température de 23° . L'agitateur étant en mouvement, on introduit rapidement le contenu du tube à essai dans la capsule en mettant en marche au même instant un chronomètre. On note le temps d'apparition de la coloration bleue qui se produit quand l'acide ascorbique est totalement oxydé par l'iode libéré. La quantité de catalyseur est calculée de façon que ce temps soit compris entre 25 et 40 secondes (fig. 11).

(76) R. WILLSTAETTER - Untersuchungen über Enzyme 1928.

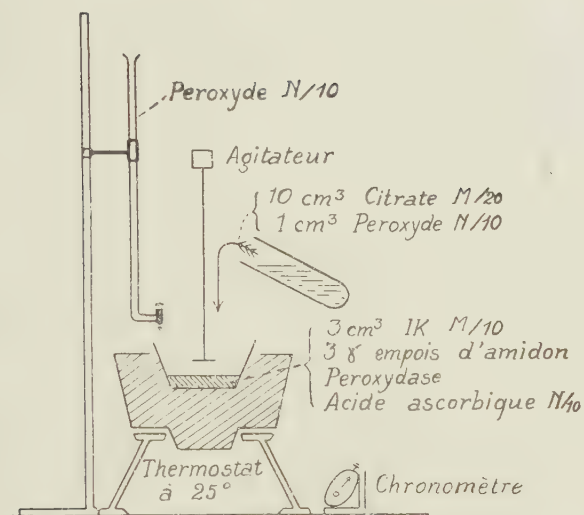


FIGURE 11

Prenons comme exemple le cas où la coloration au cours de ce premier essai apparaît au bout de 30 secondes : c'est le temps au bout duquel l'acide ascorbique N/10, introduit ($0,5 \text{ cm}^3$) est oxydé. Dans un deuxième essai on introduit la même quantité de catalyseur et 2 cm^3 d'acide ascorbique N/10; la quantité initiale de peroxyde (1 cm^3) étant insuffisante, on ajoutera goutte à goutte, entre 30 secondes et 2 minutes, $1,5 \text{ cm}^3$ de peroxyde N/10, de façon à en maintenir à peu près constante la concentration : le débit de la burette sera réglé de façon que $0,1 \text{ cm}^3$ de peroxyde N/10 soit introduit toutes les 6 secondes; en effet, dans le cas particulier $0,5 \text{ cm}^3$ de peroxyde N/10 est utilisé par le système en 30". Dans les essais suivants, on fait varier les quantités d'acide ascorbique de façon à obtenir un temps d'apparition de la coloration bleue compris entre deux et trois minutes et un autre entre 3 et 4 minutes. On évalue graphiquement la quantité d'iode N/100 libérée par le système au bout de 3 minutes en portant en abscisse les temps et en ordonnée l'acide ascorbique oxydé par l'iode libéré (fig. 12).

Cette méthode est simple, rapide et très précise. Elle a l'avantage de permettre l'étude de la cinétique du système

peroxydasique. Deux cas peuvent se présenter (fig.) : l'activité peroxydasique s'inscrit linéairement selon une droite ou au contraire elle diminue progressivement et la courbe tend vers une asymptote horizontale.

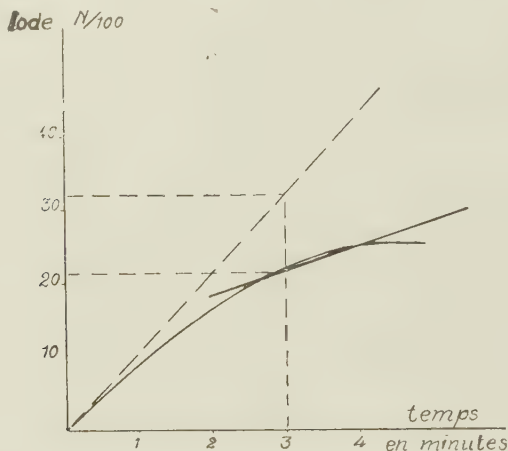
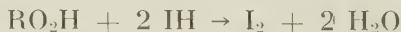


FIGURE 12
Détermination de « U. I. a ».

M. F. JAYLE

On exprime l'activité du système en unités d'iode titré en retour par l'acide ascorbique. Le symbole « U.I. a » représente la quantité d'iode N/100 libéré par le système au bout de 3 minutes. On ramène par le calcul cette quantité à 1 mg du catalyseur utilisé ou à un volume déterminé de sa solution.

b) Méthode volumétrique directe de WOLFF et STOECKLIN (77), modifiée par M.-F. JAYLE (48). — La méthode basée sur l'activation par une peroxydase de la réaction d'un peroxyde sur l'acide iodhydrique (KUHN et BRANN).



Dans une capsule plongeant dans un thermostat, réglé à 23°, on introduit successivement 10 cm³ d'une solution tampon de citrate M/20, 3 cm³ d'iodure M/10, 5 gouttes d'empois d'amidon à 5 %, la solution de l'enzyme et 1 cm³ de peroxyde

(77) J. WOLFF et E. DE STOECKLIN C. R. 151 p. 483. Ann. Inst. post. 1911 - 1 - 213.

N/10 en opérant comme dans la précédente technique. On commence au bout de 1 min. 1/2 à titrer l'iode libéré par de l'hyposulfite N/100, de façon à terminer la titration à 5 minutes exactement. On rapporte par le calcul le chiffre obtenu, soit à 1 mg de catalyseur, soit à un volume déterminé de la solution peroxydasique et on obtient ainsi une unité conventionnelle que l'on représente par le symbole U.I. Cette méthode est simple mais n'est précise que dans le cas où de petites quantités de catalyseurs sont employées, de façon que U.I. reste expérimentalement inférieur à 3. Cette méthode est employée par M. POLONOVSKI et JAYLE pour la mesure de l'indice d'haptoglobulinémie.

Pour l'étude de la cinétique des réactions catalytiques, nous avons opéré suivant le même principe, mais à une dilution beaucoup plus grande et en maintenant constante, au cours de chaque opération, la température, le pH et la concentration du peroxyde et du substrat réducteur. Une burette dont le débit est réglé par la consommation de la peroxydase en substrat oxydant permet de maintenir sa concentration initiale. L'iode est titré au fur et à mesure de sa libération, de sorte que la quantité d'iodure en solution ne varie pas.

L'opération est conduite de la façon suivante :

Dans une capsule de 200 cm³ de capacité plongeant dans un thermostat réglé à 25° et muni d'un agitateur rotatif, on introduit 20 cm³ d'une solution citratée préparée en mélangeant des solutions M/20 de citrate monosodique et de citrate trisodique, 10 cm³ d'une solution de IK M/2 (83 gr. par litre), 0,5 cm³ d'empois d'amidon et de l'eau distillée *q. s. p.* 98 cm³. Au moment de l'addition de 2 cm³ de peroxyde de la concentration choisie on met en marche un chronomètre.

L'iode est dosé chaque minute par une solution d'hyposulfite N/50 en commençant à 45 secondes et en terminant à la minute de façon à ce que la solution conserve une teinte légèrement bleutée correspondant à une goutte d'iode N/100. Il est en effet important d'éviter le contact de l'hyposulfite avec l'enzyme en raison de l'influence de ce réducteur sur la vitesse de la réaction.

En dehors de sa précision très grande, pour un expérimentateur habitué, ce dosage iodométrique direct présente, sur les autres, l'avantage de permettre l'étude régulière de la réaction en fonction du temps. La variation de la gamme du

pH, entre 3 et 7 et l'expression des résultats par deux modes différents de calcul :

Soit : a) la quantité d'hyposulfite utilisée par la réaction pendant le temps choisi et b) celle qui correspond au témoin sans catalyseur.

La différence $a - b$ donne l'activation simple et est exprimée par le symbole « U.I. ».

Le rapport $\frac{a}{b}$ représente le coefficient d'activation de la réaction (C.A.).

On conçoit facilement que U.I. soit d'autant plus grand que la concentration en substrats et en catalyseur est plus importante. Au contraire C.A. pourra varier en sens inverse si l'affinité de l'enzyme pour les substrats réducteur et oxydant augmente avec la dilution.

Dans le cas de l'hémoglobine un seul chiffre de U.I. et de C.A. se rapportant à 6, 10 ou 15 minutes, ne permet pas de donner une mesure précise de l'activité de son pouvoir peroxydasique. Nous nous sommes particulièrement attachés à l'étude de la destruction de ce pigment par le peroxyde et celle-ci implique des déterminations fréquentes à intervalles réguliers.

A chaque intervalle correspond une certaine quantité d'iode libérée par les deux réactions et c'est leur différence et leur rapport qui nous donne une mesure du facteur destruction en fonction du temps.

Prenons un exemple, soit x^I , x^{II} , x^{III} , x^{IV} , x^V , les quantités d'iode libérées après 1, 2, 3, 4, 5 minutes par la réaction activée et a les quantités d'iode mise en liberté chaque minute par le témoin. Les activations dans chaque intervalle de temps seront représentés

$$\begin{aligned} \text{en 1 minute par U.I.} &= x^I - a & \text{et C.A.} &= \frac{x^I}{a} \\ \text{en 2 minutes par U.I.} &= (x^{II} - x^I) - a & \text{et C.A.} &= \frac{x^{II} - x^I}{a} \\ \text{en 3 minutes par U.I.} &= (x^{III} - x^{II}) - a & \text{et C.A.} &= \frac{x^{III} - x^{II}}{a} \\ && \text{etc...} & \end{aligned}$$

Les symboles U.I. et C.A. permettent le calcul du coefficient de destruction de l'hémoglobine par le rapport

$$\frac{\text{U.I. } x^{min.}}{\text{U.I. } (x+1)^{min.}} \text{ et } \frac{\text{C.A. } x^{min.}}{\text{C.A. } (x+1)^{min.}}$$

CHAPITRE II

ETUDE DE L'ACTION CATALYTIQUE DE L'HEMOGLOBINE

SCHÖNBEIN (78) a montré le premier que l'hémoglobine avait la propriété d'activer l'eau oxygénée. De nombreux auteurs se sont attachés à différencier l'action de l'hémoglobine de celle d'une peroxydase végétale. CZYLHARTZ et FURTH (79) trouvent des divergences fondamentales entre le comportement de ces catalyseurs dont l'activité se traduit par des courbes différentes. BATELLI et STERN (80) fixent la température optimum à 55° pour l'hémoglobine et à 37° pour la peroxydase. A. BACH et S. ZUBKOWA (81) mettent au point un microdosage de l'activité peroxydasique du sang. Ils trouvent que l'hémoglobine est thermostable, alors que l'action peroxydasique d'une solution de sang très dilué est thermolabile; ils attribuent l'activité de celle-ci à la présence d'une peroxydase dans le sang. WOLFF et STÖCKLIN (77) montrent que l'hémoglobine, dans la réaction de l'oxydation de l'acide iodhydrique par l'eau oxygénée, fonctionne comme une véritable et très active peroxydase. WILLSTAETTER et POLLINGER (82) con-

(78) SCHÖNBEIN - Journ. of. prakt. Chem. 1858 - **72** - 78.

(79) CZYLHARTZ (E.V.) et FURTH (O.V.) Hofmeister Beitrage Zs. Chem. Phys. et Path. 1907 - **10** - 358.

(80) BATELLI et STERN - Bioch. Zs. 1908 - **13** - 44.

(81) BACH (A.) et ZURKOWA (S.) - Bioch. Zs. **125** - 288.

(82) R. WILLSTAETTER et A. POLLINGER. Lieb. 1927 - **430** - 269.

firmement leur conception, mais réussissent à préparer des peroxydases végétales très actives et établissent, par leur méthode de dosage au pyrogallol (page 57), que la différence fondamentale séparant l'hémoglobine d'une peroxydase végétale est la faiblesse de son action enzymatique qui est 10.000 à 30.000 fois inférieure à celle des peroxydases végétales. Ces résultats rayaient pratiquement le pigment sanguin du groupe des catalyseurs biologiques. M.-F. JAYLE, par sa méthode de dosage, qui tient compte de la spécificité à l'égard du peroxyde et du substrat et du pH optimum de l'action de l'enzyme étudié (page 60), montre que les résultats exprimés par le symbole « UIa » et obtenus soit avec une peroxydase active, soit avec l'hémoglobine, sont d'un ordre de grandeur comparable et que le rapport de ces activités tombe de 10.000 selon WILSTATTER aux environs de 100. L'hémoglobine est donc une peroxydase moyennement active dont le comportement est différent de celui des peroxydases végétales, mais s'en rapproche beaucoup, quand son système de peroxydation est complété par une substance réductrice dont le type le plus parfait est la vitamine C.

A. — *Activation comparée des différents peroxydes
en présence des différents substrats*

L'activité de 1 mg d'oxyhémoglobine exprimée en « P.Z. » est comprise suivant les espèces entre 0,09 et 0,15.

Pour une même espèce, l'activité n'est pas constante, mais oscille dans des limites étroites. Ce qui ressort de la comparaison des P.Z. et U.I. a. c'est la différence d'activité peroxydasique que l'on trouve en fonction de la méthode employée. Le tableau III évalue les activités catalytiques de la peroxydase du raifort et de HbO^2 en P.Z. et en U. I. a. suivant que l'on utilise ROOH ou H_2O_2 . Les U.I.a. $\text{C}_2\text{H}_5\text{OOH}$ sont environ le quart des U.I.a. H_2O_2 . Cependant l'activation de l'hydroperoxyde d'éthyle est appréciable; elle ressort encore plus nettement de la comparaison des coefficients d'activation de la réaction mesurée par le rapport de l'iode libéré par la réaction catalysée (U.I.a.) à l'iode libéré dans les mêmes con-

ditions et pendant le même temps par le témoin sans per-
U.I. a.

oxydase : ————— (3 minutes).

U.I. tém.

U.I. tém. $H_2O_2 = 0,36$ U.I. tém. $C_2H_5OOH = 0,09$ U.I. tém. $CH_3OOH = 0,18$. Les coefficients d'activation sont dans le cas de la peroxydase de raifort de 722 pour le peroxyde de méthyle. Il en ressort que ce dernier n'est que faiblement activé par les peroxydases végétales. Dans le cas particulier de l'hémoglobine de cheval on voit que le chiffre trouvé, avec l'eau oxygénée est presque 10 fois plus grand dans le cas de l'oxydation de l'acide ascorbique que dans celui de l'oxydation du pyrogallol. Il devient 40 à 50 fois plus élevé si on substitue à H_2O_2 l'hydroperoxyde d'éthyle. Ainsi U.I.a. C_2H_5OOH est 4 fois plus fort que U.I.a. H_2O_2 . On observe l'inverse avec les peroxydases. Pour HbO_2 , le coefficient d'activation de la réaction passe de 2,8 avec H_2O_2 à 52 avec C_2H_5OOH . Mais l'opposition est encore plus frappante dans le cas de l'hydroperoxyde de méthyle, qui donne les chiffres les plus élevés avec HbO_2 et les plus faibles avec les peroxydases.

TABLEAU III

Activité de différentes préparations de peroxydases végétales exprimées en chiffres de purpurogallines (PZ) et en activité d'iode (UIa et UI).

Enzyme 1 mg.	PZ H_2O_2	PZ C_2H_5OOH	UIa H_2O_2	UIa C_2H_5OOH	UIa CH_3OOH	UI H_2O_2	UIa UI tém. H_2O_2	UIa UI tém. C_2H_5OOH	UIa UI tém. CH_3OOH
Peroxydase de raifort.	330	80	260	70	24	260	722	777	138
HbO_2 Cheval	0,152 (1)	0,10	1,02	4,7	6	1,2	2,8	52	33
		env.							

TABLEAU IV

*Activités comparées d'une peroxydase active de l'hémoglobine
et de la méthémoglobine*

1 mg. d'enzyme	P.Z. H_2O_2	UI (23°) H_2O_2	UIa (37°) H_2O_2	UIa (37°) CH_3OOH
Peroxydase du raifort ..	1.000	780	1.170	96
HbO ₂ (cheval)	0,152	1,02	2	12
Methb.	0,2	3,2	6,4	19,2
Peroxydase raifort				
— HbO ₂ cheval	8.700	765	585	8

$$\frac{\text{Peroxydase UIa } H_2O_2}{Hb \text{ UIa } CH_3OOH} = \frac{1170}{12} < 100$$

$$\begin{aligned} 1 \text{ g. de raifort } UIaH_2O_2 &= 0,8 \\ 1 \text{ gr. de sang } UIaC_2H_5OOH (37^\circ) &= 1.800 \end{aligned}$$

U.I. C_2H_5OOH est le tiers de U.I.a C_2H_5OOH , alors qu'avec la peroxydase végétale, ces unités sont égales. Le tableau IV met en évidence la remarquable activation des hydroperoxydes d'éthyle et de méthyle par l'hémoglobine comparativement à celle du peroxyde d'hydrogène. Il y a un renversement des activations observées au cours de l'étude des peroxydases et à la spécificité relative des enzymes à l'égard du peroxyde d'hydrogène, se substitue ici celle de l'hémoglobine vis-à-vis des hydroperoxydes d'alcyle qui sont environ vingt fois plus actifs que l'eau oxygénée. En employant pour chaque système une méthode de dosage appropriée, le rapport de l'activité de ces catalyseurs biologiques n'est plus de 10.000 à 30.000 (WILLSTAETTER), mais de 100 à 300 seulement. La peroxydase la plus active du règne végétal conserve bien toujours la première place, mais si on rapporte à un gramme de tissu les unités précédentes, le sang devient 1.500 fois plus actif que le raifort qui est la plante la plus riche avec la figue en peroxydase (tableau IV).

Il existe donc pour l'hémoglobine un système spécifique (1)

(1) $ROOH - Hb - \text{acide ascorbique}$.

qui est différent de celui que SZENT-GYORGYI a donné pour les peroxydases végétales (2).

(2) HOOH — peroxydase — flavone — acide ascorbique.

B. - *Variation de l'activité peroxydasique de l'oxyhémoglobine en fonction du pH*

Un des premiers, FERNBACH, en 1890, à propos de la sucrase et de l'amylase, insista sur l'importance de la réaction du milieu sur l'activité diastasique. En collaboration avec HUBERT, dix ans plus tard, au cours d'une étude sur l'influence des phosphates et de quelques autres matières sur les diastases protéolytiques du malt, il définit le rôle des *substances tampons* et introduisit dans la littérature biochimique ce terme qui devait être repris plus tard par les auteurs étrangers.

Mais il revient à SORENSEN d'avoir établi sur une base indiscutable cette notion que l'activité diastasique était intimement liée à la réaction du milieu, exprimée par la concentration en ions H.

Trois diastases distinctes : l'invertine, la pepsine et la catalase lui servirent d'exemples et lui permirent de généraliser cette notion à toutes les diastases et de démontrer qu'il est toujours indispensable de tenir compte de l'existence d'une réaction optimum fonction de la concentration en ions H (CH), exprimée sous la forme plus commode de son logarithme changé de signe, le pH .

Variation du pH optimum sous l'influence de divers facteurs. — On sait que la réaction du milieu pour laquelle l'activité du ferment passe par un maximum ne constitue pas une véritable constante caractéristique d'une diastase, mais qu'elle est susceptible de varier selon les circonstances. L'étude que nous avons entreprise de la réaction optimum de l'action hydroalcylaperoxydasique de l'hémoglobine et de ses dérivés en fonction du pH nous a montré que ce point optimum est sous la dépendance d'un assez grand nombre de conditions :

1° de la nature du tampon :

2° de la concentration de l'hydroperoxyde d'alcyle ;

3° de la température;

4° de la concentration de la solution d'hémoglobine.

1° *L'influence des sels tampons sur le pH optimum de HbO_2*

La variation d'activation est en relation avec le pH. Nous avons préparé des milieux tamponnés au même pH, au moyen de substances différentes et examiné ce que devient l'activité de l'hémoglobine dans ces solutions.

Conditions expérimentales. — Nous avons essayé trois milieux constitués par des mélanges en proportions convenables, le premier de citrate monosodique et trisodique, le second d'acide acétique et d'acétate de sodium, le troisième de phosphates monopotassique et disodique ou d'acide phosphorique. L'échelle de pH est comprise entre 3,6 et 5,75.

Le tableau (n° V) représente l'activation, au bout de deux minutes, en fonction du pH et de la nature du tampon. Le dosage a été conduit à 25° par la méthode indiquée page 63

N

en utilisant 2 cm³ d'hydroperoxyde — soit 0,000062 gr. de
10
peroxyde, ce qui porte la concentration du milieu à N/500.

Variation d'activité en fonction du temps aux différents pH

Nous avons d'abord étudié le phénomène au cours des deux premières minutes aux différents pH. Ensuite nous avons suivi la réaction pendant 10' aux mêmes pH.

a) *Tampon citrate.* — Le pH optimum de la catalyse de HbO_2 est situé ici à 4,95 (fig. 13).

En faisant varier le pH et si nous suivons la réaction au cours des deux premières minutes, nous constatons de pH 4,2 au pH 5 une décroissance régulière du dégagement de l'iode (tableau n° VIa dans lequel les chiffres sont rapportés à l'iode N/5000 pour faciliter la lecture). C'est-à-dire qu'au cours de la première minute, le dégagement d'iode est *supérieur* à celui de la deuxième minute, et celui de la 2^e minute est supérieur à celui de la troisième minute, etc... Mais à partir d'un certain pH (5,2, 5,30 et 5,60, etc.) le dégagement d'iode pour la première minute est *inférieur* à celui de la

deuxième minute, et l'écart continue à augmenter lorsque le pH croît vers l'alcalinité.

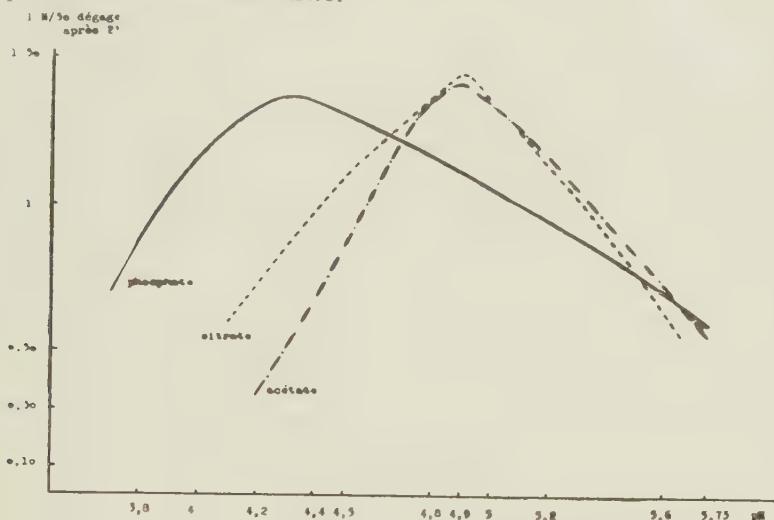


FIGURE 13

Influence du sel tampon et du pH sur l'activité catalytique de HbO_2

Donc, dans la région du pH acide, l'établissement de la réaction est instantanée. Aux pH moins acides (5 à 5,80) il est moins rapide, ce qui signifie que la fixation du peroxyde sur le catalyseur est plus lente. À ces pH la destruction de l'hémoglobine ne commence qu'au bout de la 5 ou 6^e minute, comme l'indique la constance relative des activations pendant ce temps.

Tampon acétate. - Le tableau VIb et la figure 13 montrent que les courbes représentatives de l'activation en fonction du pH en milieu citrate et acétate sont presque superposables. Le pH optimum est situé à 4,95. De même si nous étudions la mise en route de la réaction, en fonction du pH, avec l'acétate nous voyons qu'à partir de pH 5,20, le dégagement d'iode pendant la première minute est inférieur à celui de la deuxième minute, et même de la troisième et quatrième minute. Mais au-dessous de pH 5, on observe, comme avec le citrate, des chiffres décroissants.

Tampon phosphate. — Le pH optimum ne coïncide pas avec celui des milieux citrate ou acétate. La forme de la courbe d'activation en fonction du pH est complètement différente en ce sens qu'elle est beaucoup plus aplatie et que son angle est obtus au lieu d'être aigu. Le pH optimum ne se situe pas en un point précis, mais dans la zone 4,2, 4,4 (tableau VIc). Ici le déclenchement de la réaction est beaucoup plus rapide au-dessus de pH 5, ce n'est que pendant 30 premières secondes que le dégagement d'iode est plus faible et que l'on peut suivre la formation de la combinaison HbO_2 -peroxyde.

TABLEAU VIa

*Influence du pH sur l'activité catalytique de HbO_2 ,
en milieu citrate exprimée en Iode N/5.000*

Temps	pH4,2	pH4,5	pH4,8	pH4,9	pH5,	pH5,2	pH5,35	pH5,45	pH5,6	pH5,75
1'	58	80	84	80	74	55	44	35	27	22
2'	20	41	62	76	74	68	64	58	47	41
3'	18	22	46	60	61	62	58	51	44	44
4'	16	19	34	48	50	51	50	41	40	38
5'	14	17	30	41	43	45	45	42	38	35
6'	13	14	28	35	40	38	39	38	35	32
7'	13	14	24	31	33	35	36	32	30	28
8'	12	13	20	29	29	30	32	30	28	26
9'	12	12	18	26	27	28	28	27	26	26
10'	11	12	18	24	25	26	26	25	26	24
	191	245	364	450	454	438	422	382	341	316

TABLEAU VIb

*Influence du pH sur l'activité catalytique de HbO_2
en milieu acétote exprimée en Iode N/5.000*

Temps	pH4,0	pH4,2	pH4,4	pH4,6	pH4,8	pH5,	pH5,2	pH5,4	pH5,6	pH5,8
1'	18	31	56	78	82	78	64	47	38	25
2'	13	14	18	38	70	72	68	55	48	40
3'	11	13	16	25	48	58	60	51	46	42
4'	11	12	14	19	35	51	53	47	42	38
5'	10	12	13	18	30	40	44	45	37	35
6'	10	12	13	18	26	38	40	38	35	32
7'	9	11	12	16	22	32	35	34	33	28
8'	8	11	11	14	20	29	32	32	30	28
9'	8	10	11	14	18	27	29	28	27	25
10'	7	10	10	12	16	26	26	28	25	24
	105	136	174	252	367	451	451	405	361	317

TABLEAU VIc

*Influence du pH sur l'activité catalytique de HbO_2
en milieu phosphate exprimée en Iode N/5.000*

Temps	pH3,8	pH4	pH4,4	pH4,6	pH4,8	pH5,	pH5,30	pH5,60
0 à 30"		46		41	35	28	18	
30" à 1'		36		37	33	36	29	
2'	36	54	58	60	60	55	54	40
3'	33	48	50	51	51	44	45	41
4'	29	40	41	39	43	40	42	37
5'	26	37	36	36	38	36	37	32
6'	25	30	33	33	34	32	32	30
7'	22	28	28	30	30	30	30	28
8'	20	27	25	26	28	28	27	25
9'	20	23	22	24	24	24	23	22
10'	18	22	22	23	22	21	21	22
	291	391	405	400	398	374	370	321

2° Influence du pH sur la destruction de l'hémoglobine

Si nous suivons, à différents pH, la courbe d'enregistrement de l'activité peroxydasique en fonction du temps, on voit dans la zone des pH inférieures à 5, que l'activité décroît régulièrement en fonction du temps et à une cadence d'autant plus grande que le pH est plus acide. C'est ainsi qu'à pH 4,5, le coefficient d'activation passe de 80 à 1' à 12 à 10' et à pH 5 de 72 à 25.

On peut par le rapport de ces chiffres se faire une idée du coefficient de destruction de HbO_2 qui est de $\frac{80}{12} = 6,6$ dans le premier cas et $\frac{72}{25} = 2,9$ dans le second.

Si on calcule ce rapport d'une minute à l'autre on peut suivre la destruction en fonction du pH et du temps. On est d'abord frappé par le fait qu'à pH 4,2-4,5 il y a une chute importante de l'activation entre la première et la deuxième minute.

Par contre de 5' à 10' l'iode dégagé reste à peu près constant. Il est vraisemblable que le chromoprotéide est très fragile pendant le temps de la formation du complexe. Ensuite la destruction de HbO_2 suit grossièrement une loi de décroissance exponentielle $y = e^{-Kx}$ (fig. 14).

Comme nous l'avons remarqué : à la chute de l'activation observée au-dessous de pH 5 pendant les premières minutes se substitue une nette augmentation entre 5,2 et 5,8 et, dans cette zone l'effet de destruction est beaucoup plus faible; le

rapport de destruction à pH 5,6 par exemple est de $\frac{48}{25} = 1,9$ alors qu'à pH 4,8, il est égal à $\frac{82}{16} = 5,1$.

Il est particulièrement intéressant d'étudier au-dessus de pH 5 la destruction de l'hémoglobine, car elle est, dans cette zone, continue et régulière, la formation du dérivé HbO_2 -peroxyde étant lente et ne s'accompagnant pas d'une destruc-

tion plus marquée du pigment au début de la réaction.

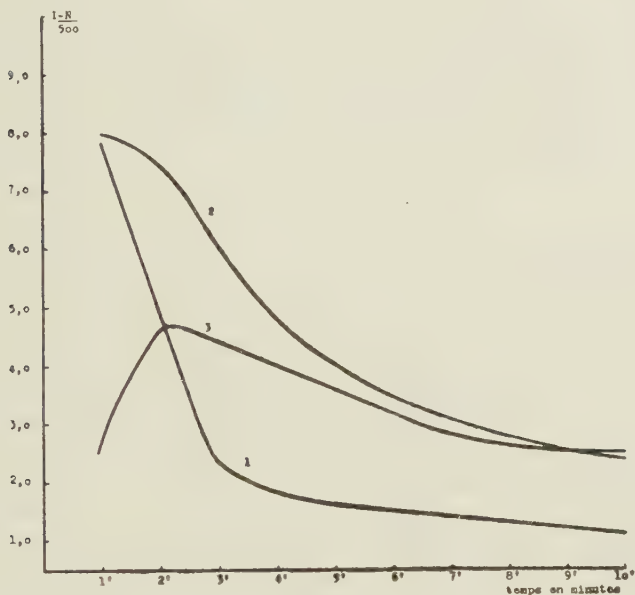


FIGURE 14

*Activité de HbO_2 en fonction du temps à différents pH
mesurée de minute en minute*

- 1 - pH 4,5
- 2 - pH 4,9
- 3 - pH 5,6

On a donc intérêt pour l'étude de la cinétique de l'action catalytique de se placer non pas au pH optimum du début de la réaction, mais au pH représentant le maximum de libération de l'iode pendant un temps assez long (10 minutes par exemple). Si on reprend le tableau n° VIa dont les derniers chiffres représentent l'addition de tous ceux qui précèdent, on remarque que le pH optimum en milieu citraté est passé de 4,8 à la deuxième minute à 4,9 - 5 à la dixième. La déviation est presque identique mais un peu plus marquée en milieu acétate (tabl. VIb), le pH passant de 4,8 à 5 puis à 5,2 selon la durée de la catalyse.

Influence des sels tampons (tableau n° V)

pH	pendant deux minutes		
	Tampon citrate	Tampon acétate	Tampon phosphate
3,8			0,86
4		0,20	1,24
4,2	0,72	0,35	
4,4	1,00	0,62	1,36
4,5	1,15		
4,6		1,04	1,28
4,8	1,35	1,37	1,16
4,9	1,46	1,43	
5	1,36	1,38	1,07
5,2	1,13	1,20	
5,2	0,98		0,90
5,35	0,83	0,90	
5,45	0,64	0,74	0,72
5,61	0,53	0,53	
5,75			

3° La variation du pH optimum en fonction de la concentration en peroxyde

L'hydroperoxyde d'éthyle se comporte comme un acide faible comparable aux phénols. Pour tous les dosages précédents portant sur la variation de l'activation en fonction du pH, nous avons opéré avec une quantité fixe de peroxyde neutralisé (2 cm³ de peroxyde N/10). Si, en maintenant constants tous les autres facteurs, nous déterminons l'activation de l'hémoglobine en fonction du pH, avec des quantités croissantes de peroxyde, nous constatons que le pH optimum est fortement déplacé vers l'alcalinité au fur et à mesure que la concentration en peroxyde augmente.

En milieu citraté, pour une concentration M/500, nous avons vu que le pH optimum se situait entre 4,9 et 5. Or ce chiffre augmente d'autant plus que la concentration est plus forte. Ainsi si on se place dans les conditions expérimentales de la technique décrite page 62, à une concentration N/150 en peroxyde, le pH optimum se situe à 5,8.

Il est facile de tirer des tableaux VI la raison de cette déviation : le pH optimum est la résultante de 2 actions opposées, la destruction du catalyseur et l'instabilité de son produit d'addition avec le peroxyde. Il se trouve que le peroxyde est le plus activé dans une zone de pH où la destruction oxydative de HbO_2 est plus importante. Le pH optimum est donc un compromis situé à l'intersection des diagrammes de destruction et d'instabilité du dérivé $HbO_2 - ROOH$.

4^e La variation d'activité de l'hémoglobine en fonction du pH est-elle indépendante de la quantité de l'hémoglobine ?

Avant d'aborder cette question, signalons que les solutions d'hémoglobine de différentes concentrations n'ont pas le même pH . Le pH des solutions d'oxyhémoglobine est un facteur assez difficile à étudier. Il ne peut être question de mesures colorométriques. Seule la méthode électrique peut donner des résultats. Lors des mesures de la pression osmotique colloïdale, alors que l'équilibre de DONNAN est établi, on peut admettre sans crainte de faire une grosse erreur, que le pH du milieu dans lequel on plonge la cellule de collodion est identique au pH de la solution contenue dans la cellule. Dans l'espèce la quantité d'oxyhémoglobine présente assurait au système une action tampon considérable. C'est donc sur le *dialysat* qu'on mesure le pH . D'après M. MACHEBŒUF et R. CASTAGNON (83), les résultats obtenus pour les solutions suivantes sont indiqués de la façon suivante :

Solution d'hémoglobine	à 14 %	pH 7,92
	à 6,5 %	pH 7,75
	à 3,5 %	pH 7,38.

Nous allons étudier la variation d'activité et le pH optimum avec deux solutions d'oxyhémoglobine à différentes concentrations. Nous opérons suivant la technique précédente en

employant dans une première série $0,2 \text{ cm}^3 \text{ HbO}_2 \xrightarrow{\text{M}} \text{1.000}$,
et dans une deuxième série $0,2 \text{ cm}^3 \text{ HbO}_2 \xrightarrow{\text{5.000}}$.

(83) R. CASTAGNON. Thèse de Doct. en pharmacie. Bordeaux 1939.

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant :

pH	0,2 HbO ₂ M/1.000	0,2 HbO ₂ M/5.000
	$\frac{1}{n}$ 10	$\frac{1}{n}$ 50
4,2	0,48	0,78
4,5	0,75	1,21
4,8	1,02	1,40
4,9	1,13	1,56
5	1,10	1,48
5,2	1,04	1,23
5,35	0,93	1,08
5,45	0,84	0,93
5,60	0,80	0,74

RÉSULTATS. — Le tableau n° VII montre que pour une solution d'HbO₂ ————, le pH optimum se situe entre 4,9 et 5,1. 5.000
Il en est de même pour la solution la plus concentrée en HbO₂.

5° Influence combinée de la température et du pH

Nous avons constaté que la température déplace vers l'alcalinité le pH optimum d'activation qui se situe à 4,9, à 25° et entre 5,1, 5,2 à 37°. L'activation est plus faible à température élevée dans la région de pH acide située entre 4 et 4,9; elle est plus forte à cette même température pour les pH compris entre 5 et 5,75. Ce phénomène est en rapport avec la fragilité du chromoprotéide sanguin vis-à-vis du peroxyde, quand on opère dans la zone acide; c'est cet effet destructeur qui sur la fig. n° 15 détermine la déviation apparente du pH optimum en fonction de la température. On observe un chevauchement des deux diagrammes représentés. La branche gauche de la courbe de 37° reste inférieure à la branche correspondante de la courbe de 25° alors que l'inverse se produit dans la portion droite du graphique. Ceci rend compte, en deçà du pH optimum, de l'influence combinée du pH et de la température, sur la destruction de l'hémoglobine. Au-dessous de pH 5, la destruction est d'autant plus importante que la température est plus élevée et que le pH est plus bas. Aussi

l'augmentation de l'activité catalytique par la température est-elle diminuée par la destruction du pigment. Au-dessus de pH 5 au contraire, l'hémoglobine est plus résistante.

Le trait pointillé qui, sur la figure 15, continue à gauche la courbe en trait plein, rend compte de la position du pH optimum à 37° dans le cas où la destruction pigmentaire ne jouerait pas. Il coïnciderait avec celui de la courbe à 25°. Il est donc à recommander pour la détermination exacte du pH optimum réel de la catalyse peroxydasique de se placer dans des conditions de température réduisant au minimum l'effet oxydatif du peroxyde.

Influence de la température sur l'activité catalytique de HbO₂ en fonction du pH

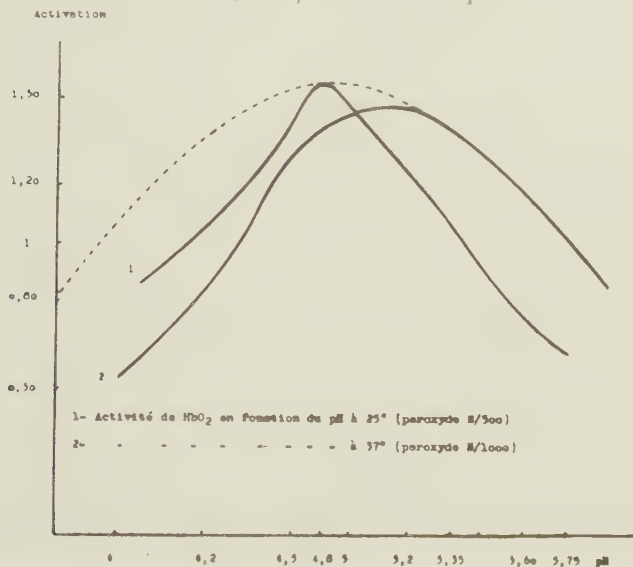


FIGURE 15

6° Influence du substrat et des réducteurs sur le pH optimum

Pour une même peroxydase, le pH optimum est fonction du substrat réducteur (BANSI et UCKO). C'est ainsi que pour la peroxydase du raifort, il se situe entre 3,7 et 4 avec l'acide iodhydrique, entre 5 et 6 avec le gaïacol, entre 4,5 et 5 avec le crésol, entre 6,5 et 7 avec le pyrogallol. Mais n'oublions

pas que dans tous ces cas il s'agit d'une activation d'une réaction de peroxydation qui évolue d'elle-même plus ou moins lentement et que le *pH* observé n'est que la composante de celui de la réaction propre et de celui pour lequel le dérivé d'oxydation supérieure du catalyseur se trouve en plus grande instabilité. On trouve à cet égard une preuve manifeste dans l'activation comparée de l'acide peracétique et de l'eau oxygénée par une peroxydase végétale (WIELAND et SUTTER).

	Acide peracétique					H ₂ O ₂			
<i>pH</i>	6,6	6,4		5,8	5	6,4	6,2	5,9	5,6
	8,5	9,5	11,	13,	21	225	217	212	202

L'activation de l'acide peracétique est d'autant plus nette que le *pH* est plus acide. C'est l'inverse avec le peroxyde d'hydrogène.

Certains substrats se prêtent mal à la détermination du *pH* optimum. L'oxydation du pyrogallol est influencée par le sel tampon et c'est la raison pour laquelle le milieu du dosage de WILLSTAETTER n'est pas tamponné. Le vert de malachite est peu soluble. On utilise une solution saturée de ce colorant réduit dans l'acide acétique et malgré l'addition d'acétate le milieu reste très acide.

L'acide iodhydrique est dans ce sens de beaucoup le plus pratique, car son oxydation est très influencé par la concentration du milieu en ions hydrogène et fournit une courbe caractéristique et très précise. Avec l'hémoglobine R. KUHN et L. BRANN (84) situent à $4,6 \pm 0,02$ le *pH* optimum en présence d'acide iodhydrique en milieu acétate ou phosphate. Par contre WOLFF et STÖCKLIN préconisent comme milieu de choix le citrate disodique dont le *pH* est à 5,7, 5,8. JAYLE confirme ce dernier résultat en opérant avec une concentration de peroxyde N/150. Nous avons vu que le *pH* optimum en milieu très dilué en peroxyde était entre 4,2 et 4,4 en présence de phosphate et à 4,8, 4,9 en présence de citrate et acétate. C'est donc une erreur de tamponner une partie de la gamme avec de l'acétate et l'autre avec du phosphate comme le font KUHN et BRANN.

(84) R. KUHN et BRAUN (L.) Zs. für physiol. Chem. 1926 - 157 - 164; 1927 - 192 - 45.

Si l'on emploie l'acide ascorbique, le pH optimum devient 4,4 en milieu citraté (JAYLE). Il est à 6 avec la cystéine et à 7 avec la glutathion.

Les substances réductrices influent considérablement sur l'activation de la réaction. Nous présentons ci-contre 2 courbes empruntées au travail de M.-F. JAYLE qui illustrent ce phénomène (fig. 16 et 17). La technique opératoire est exposée

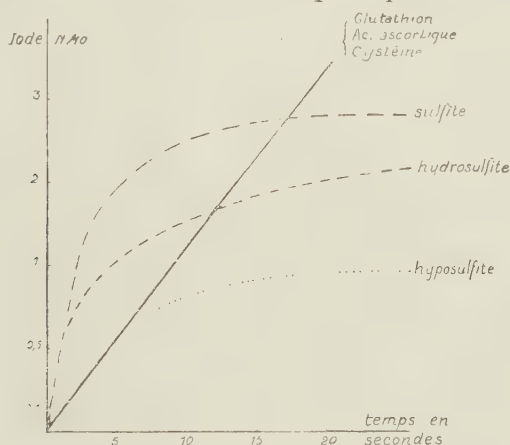


FIGURE 16
Influence des réducteurs sur le système : H_2O_2 —Peroxydase—IH.

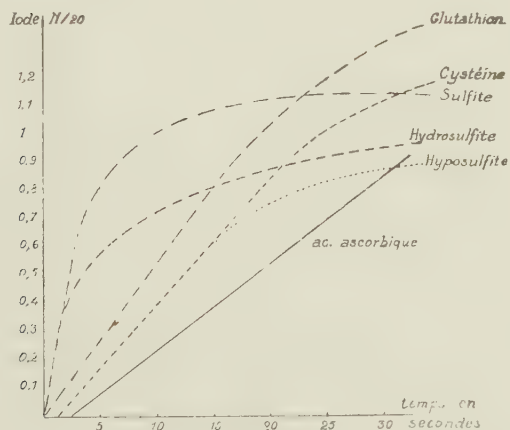


FIGURE 17
Influence des réducteurs sur le système C_7H_8OOH — HbO_7 —IH.

page 60. On substitue, à l'acide ascorbique, le glutathion ou la cystéine, ou le sulfite, ou l'hydrosulfite, ou l'hyposulfite. La fig. 16 montre que, pour la peroxydase végétale, la vitesse de la libération de l'iode est la même en l'absence des réducteurs comme en présence d'acide ascorbique, de glutathion de cystéine ou d'hyposulfite de sodium.

On a dans ces cas $U_{ia} = UI$ (définition de ces symboles pp. 62 et 64). Ces réducteurs n'influent pas sur la réaction peroxydasique. Cependant, en présence d'hyposulfite, la vitesse diminue rapidement pour s'annuler au bout de 2 à 3 minutes. Il s'agit d'un arrêt de la réaction par destruction de catalyseur sous l'influence combinée de l'hyposulfite et du peroxyde. Ces deux substances sont séparément sans action sur l'enzyme même après un temps de contact d'une heure; mais il suffit de les mélanger pour détruire rapidement la peroxydase qui est sensibilisée par l'hyposulfite à l'action oxydante du peroxyde. Le même phénomène s'observe avec les autres réducteurs minéraux (sulfite, hydrosulfite). Mais dans ce cas la vitesse de la réaction est considérablement augmentée au début. Dans le système « H_2O_2 - peroxydase - IH - acide ascorbique », l'acide iodhydrique est le substrat oxydable, l'iode libéré jouant le rôle d'oxydant intermédiaire de la vitamine C. Dans la technique indiquée page 60 on remplace les 3 cm³ d'iode M/10 par 3 cm³ d'eau distillée et on constate que, en dosant l'acide ascorbique toutes les minutes dans les échantillons différents, son oxydation catalysée par la peroxydase est très faible. Ces résultats confirment ceux de SZENT-GYÖRGYI et de SAINT-MUSJAK qui établissent que le jus de fruit contient une substance permettant l'oxydation de l'acide ascorbique par l'eau oxygénée en présence de peroxydase. Il s'agit de substances flavoniques qui sont oxydées par le système peroxydasique en dérivés quinoniques et ceux-ci transforment l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique. L'acide iodhydrique joue dans la réaction de ce dosage le rôle de ces flavones dans les systèmes d'oxydation des végétaux. Contrairement à ce que l'on observe au cours de l'étude des peroxydases, les réducteurs biologiques (acide ascorbique, glutathion, cystéine) influent considérablement sur l'activité de l'hémoglobine.

a) La figure 16 montre qu'à pH 3.7, la vitesse de la réaction est d'autant plus grande que le pouvoir réducteur de l'accep-

teur de l'iode est plus grand. Mais ceci n'est vrai qu'au début de la réaction, car l'hémoglobine est rapidement détruite dans un pareil système. On observe le coefficient d'activation le plus élevé avec le sulfite ou l'hydrosulfite, ensuite avec le glutathion, la cystéine et en dernier lieu avec l'acide ascorbique.

b) En présence des réducteurs minéraux forts, la vitesse est considérablement augmentée et l'allure générale de la courbe est la même que dans le cas de la peroxydase (fig. 6). Ceci est en accord avec le fait que la fraction active des peroxydases végétales, comme celle du pigment sanguin, est bien une porphyrine ferrugineuse.

c) Le pH optimum du système $ROOH - HbO_2 - IH$ qui est compris entre 5,5 et 6 en l'absence de réducteur minéral, est porté à 3,7 en présence d'un réducteur minéral qui déplace le pH optimum de HbO_2 à la même valeur que dans le cas des peroxydases végétales.

L'acide ascorbique, selon le pH , peut fonctionner comme substrat ou comme réducteur.

C'est ainsi qu'à pH 3,7 il sert d'accepteur de l'iode libéré et n'intervient que pour modifier la vitesse de la catalyse (1) A pH 4,3 - 4,5 il devient le substrat oxydable (2).

(1) A pH 3,7 fonctionne le système $ROOH - HbO_2 - IH$ - acide ascorbique.

(2) A pH 4,4 fonctionne le système $ROOH - HbO_2$ - acide ascorbique - IH .

C. *Etude systématique des facteurs influençant l'activité catalytique de HbO_2*

1° INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN IODURE.

KUHN et BRANN avaient déjà indiqué que la concentration de l'iodure n'intervenait pas dans la cinétique de la réaction catalysée; ils en déduisaient qu'il n'était pas possible de considérer que le substrat activé soit l'acide iodhydrique. Nous avons repris systématiquement cette question et nos résultats sont représentés sur le tableau n° VIII.

Nous avons opéré avec des concentrations croissantes d'iodure en présence d'une concentration faible de peroxyde (N/500), c'est-à-dire dans les conditions où une inhibition, si elle avait lieu, ne pourrait être masquée par une concentration trop forte du peroxyde; car il existe, ainsi que MANN l'a établi, un équilibre entre les concentrations des 2 substrats.

Les concentrations d'iodure de la solution varient de M/100 à M/6,6. La concentration du peroxyde est fixée à M/500. L'activation exprimée en iode N/50 dégagé pendant 5 minutes augmente de 1,24 à 1,48 quand les concentrations du milieu en iodure passent de M/100 à M/20. Au-delà, le diagramme marque un plateau. Le coefficient d'activation, par contre, augmente d'autant plus que l'iodure est en plus faible quantité. Il tend vers l'infini pour de très basses concentrations, ce qui prouve qu'il existe une dissociation complète entre les réactions simple et catalysée. Le coefficient d'activation est sans aucun rapport avec le degré de la catalyse. Il résulte de cette étude que la loi de MICHAELIS et sa mesure de l'affinité ne s'appliquent pas à l'acide iodhydrique, incapable, aux concentrations élevées, d'effectuer une inhibition de l'enzyme et présentant simplement une concentration optimum d'activation.

Cela ne signifie pas que le substrat réducteur ne soit pas attiré dans la sphère d'action du dérivé d'oxydation supérieure, mais simplement qu'il n'est pas activé par ce complexe qui l'oxyde à l'état ionisé quand sa concentration atteint, à la périphérie de l'hémoglobine, une certaine valeur à laquelle le rendement est maximum; au-delà, la catalyse n'est plus augmentée ni diminuée. Cette concentration représente la saturation par rapport à la quantité employée de peroxyde. C'est la limite inférieure de cette saturation que nous avons employée dans nos essais.

TABLEAU VIII

Solution de IK à 166 gr. par Lit. (M/l)	Concentration moléculaire du milieu en IK	I.N/100, en cm3, dégagé			C.A.
		0,2 cc. d'hémog.	Témoin	Activ. catalytique	
1 cc.	1/100	1,25	0,007	1,24	178
2 cc.	1/50	1,38	0,014	1,36	98,5
4 cc.	1/25	1,45	0,027	1,42	51,7
5 cc.	1/20	1,50	0,035	1,47	42,8
7 cc.	1/14,3	1,53	0,050	1,48	30,6
10 cc.	1/10	1,56	0,070	1,48	22,1
15 cc.	1/6,6	1,60	0,110	1,48	14,5

Conditions expérimentales : 0,2 cm³ d'HbO₂ M/2000, 20 cm³ sol. citratée pH 4,9, IK en quantités indiquées - 2 cm³ peroxyde

n
— et eau distillée *q.s.p.* 100 cm³.

10

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU PEROXYDE

La fig. n° 18 représente, en fonction du temps, la variation du coefficient d'activation de HbO₂ pour différentes concentrations en peroxyde, les C.A. étant calculés de 2' en 2'. Les courbes représentées ont une allure exponentielle, ce qui signifie que la destruction de HbO₂ suit grossièrement une loi de décroissance exponentielle :

$$Y = e - Kt$$

dont la dérivée $Y' = KY$:

$$Y' = \frac{dx}{dt} = -Kx$$

En intégrant :

$$\begin{aligned} \text{Log}_n xt &= -Kt + \text{Constante.} \\ &= -K(t + \alpha) \end{aligned}$$

Mais pour xto , $\alpha = 0$.

(1) $\text{Log}_n x = -Kt$
 équation dans laquelle x représente la concentration en hémoglobine à l'instant t et K le coefficient de destruction de HbO_2 . A l'instant $t + 1$, on a :

$$(2) \text{Log}_n x_1 = -Kt_1$$

en retranchant (2) de (1)

$$-K = \frac{1}{t_1 - t} \text{Log}_n \frac{x}{x_1}$$

L'intervalle $t - t_1$ au cours de nos essais est de 1' ou de 2'.

$$K = \log_n \frac{x}{x_1} \quad \text{ou} \quad K = \frac{1}{2} \log \frac{x}{x_2}$$

$$k = 0,4343 K = \log_{10} \frac{x}{x_1}$$

On peut plus simplement admettre que dans l'intervalle de temps de 1 minute, la quantité d'hémoglobine détruite (dx) est proportionnelle à la constante de destruction que multiplie la concentration de HbO_2 à l'instant t , et par simplification on substitue aux concentrations variables de HbO_2 son activité catalytique (x) aux instants t et t_1 .

$$\frac{x - x_1}{t - t_1} = -K_D x$$

$$\text{Si } t - t_1 = -1$$

$$K_D = \frac{x - x_1}{x} = 1 - \frac{x}{x} = \frac{x - x_2}{2x}$$

On note immédiatement, qu'au pH optimum de l'activité de l'hémoglobine, la moyenne des K_D est d'autant plus forte que la concentration du peroxyde est plus élevée.

En effet, pour les peroxydes dilués ($N/500$, $N/1250$, $N/2500$), le coefficient d'activation (C.A.) diminue lentement du début à la fin de la réaction, tandis que, pour les peroxydes concentrés, au-dessus de ($N/500$), C.A. subit une forte diminution

entre 2' et 4' et se stabilise ensuite (Tableau n° IX). Ainsi pour le peroxyde N/50, on voit que C.A. tombe de 15 à 5,2

$$\frac{M}{5000}$$
(sol. HbO_2 ———) et pour le peroxyde N/100 de 22,5 à 7.

La chute de l'activation est de l'ordre de 65 %. Alors qu'entre 6' et 8' la différence est plus faible.

Dans le premier cas de 4,1 à 3,3.

Dans le deuxième cas de 5,5 à 4,7.

Ceci est vraisemblablement dû au fait que l'hémoglobine est plus fragile que son dérivé d'oxydation formé et sa destruction oxydative a lieu surtout au début, lors de la formation du composé d'addition de HbO_2 .

Les valeurs de K_D varient en fonction du temps et on ne peut tirer à ce point de vue aucune indication précise à pH 4,9. K_D diminue régulièrement et reste faible entre 6' et 20'. La destruction oxydative de HbO_2 n'est donc pas régulière et elle varie selon le stade auquel elle a lieu, les composés qui prennent naissance, ayant une résistance d'autant plus grande que la réaction évolue depuis plus longtemps.

A pH 4,9, les courbes des coefficients d'activation ont une allure exponentielle sans qu'on puisse calculer la constante K de la formule $y = e^{-Kt}$. Remarquons que l'installation de la réaction est d'autant plus rapide que le peroxyde est plus concentré et le pH plus acide.

En somme, les diagrammes ont tous la même forme, mais leur expression mathématique est impossible en raison de la destruction oxydative progressive du catalyseur, qui donne naissance à une série de dérivés ayant une résistance et une action peroxydasique propres.

L'avant-dernière colonne du tableau IX a trait aux coefficients d'activation qui, comme dans le cas de l'iodure, expriment la dissociation existant entre les réactions de peroxydation en présence et en l'absence de catalyseur. Il passe de 56 pour le peroxyde (N/2500) à 9,2 pour le peroxyde (N/25), augmente donc proportionnellement à la dilution, mais varie beaucoup plus entre (N/50) et (N/500) qu'entre (N/500) et

(N/2500). Dans le cas des concentrations élevées, il diminue de 50 à 9,2. Dans celui des concentrations faibles, il passe seulement de 50 à 56.

Coefficient d'activation de la réaction en fonction du temps pour différentes concentrations en peroxyde pH 4,9

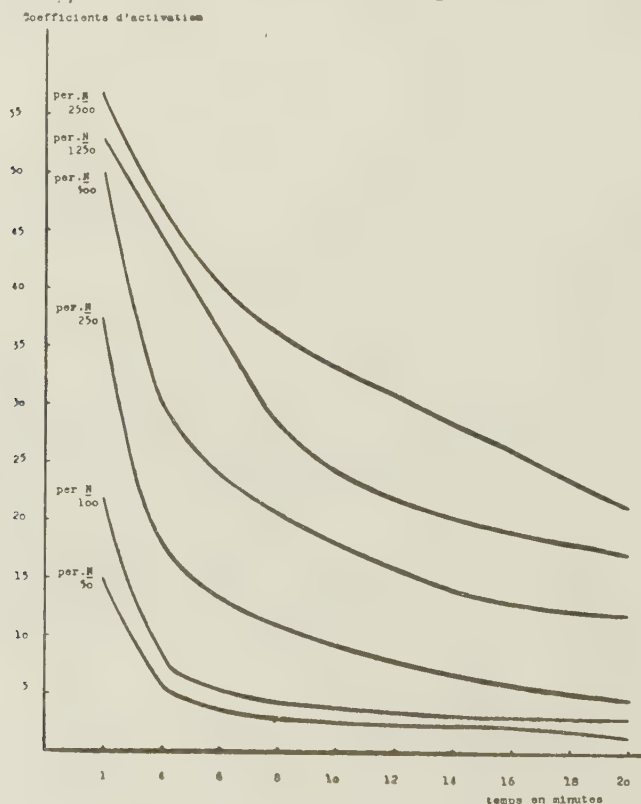


FIGURE 18

Mais, là encore, on ne peut mettre en évidence, à l'encontre de ce qui se passe avec la peroxydase, une inhibition du catalyseur. Au contraire, comme l'indique la courbe de WILLSTAETTER que nous reproduisons fig. n° 19, l'activité de HbO_2 augmente proportionnellement à la concentration du peroxyde.

Il est beaucoup plus instructif d'étudier la destruction du pigment sanguin à pH 5,6, car elle est beaucoup plus cons-

tante et l'oxydation brutale du début est ici remplacée par une installation lente du dérivé $\text{HbO}_2 - \text{Rooh}$. Aussi K_D reste-t-il sensiblement constant en fonction du temps, quelle que soit la concentration en peroxyde (tableau X). Il est d'autant plus faible que le peroxyde est plus dilué et passe de 0,46 pour N/50 à 0,08 pour N/2500.

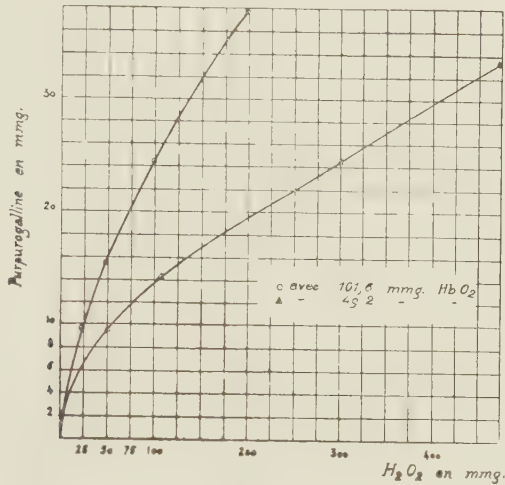


FIGURE 19

Influence, sur l'activité peroxydasique de l'oxyhémoglobine du Cheval, de la concentration de H_2O_2 .

(D'après R. WILLSTATTER et A. POLLINGER).

On peut dire que la destruction de HbO_2 à pH 5,6 est à peu près nulle quand la concentration du peroxyde descend au-dessous de N/1000.

Les fig. 20 et 21 donnent une démonstration parfaite de la formule exponentielle de la courbe et de la réalité de la formule $y = e^{-Kt}$; elles représentent le logarithme de l'activité de HbO_2 calculée de minute en minute en fonction du temps et montre que la diminution logarithmique de l'activation est linéaire à partir du moment où le dérivé $\text{HbO}_2 - \text{Rooh}$ est formé. Cela signifie que sa destruction ne dépend que de la concentration en peroxyde et la diminution linéaire du log. de l'activité indique l'usure du catalyseur, dans les conditions expérimentales choisies.

La pente du diagramme mesure l'importance du processus oxydatif. On remarque que pour Rooh N/1000, la catalyse

ture très longtemps. Au contraire, elle est rapidement suspendue pour Rooh N/250.

Log. de l'activité de HbO_2 en fonction du temps à différents pH

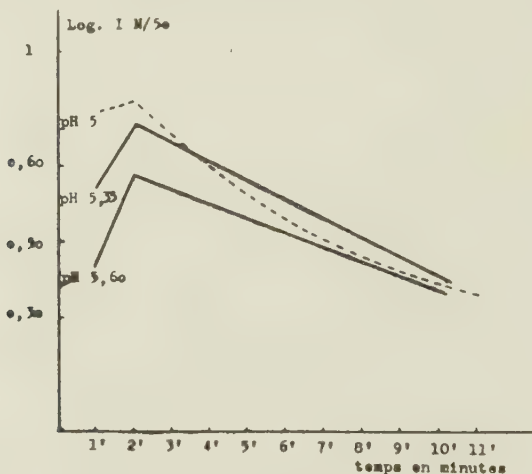


FIGURE 20

Log. de l'activité de HbO_2 à pH 5,6 en fonction du temps à différentes concentrations en peroxyde

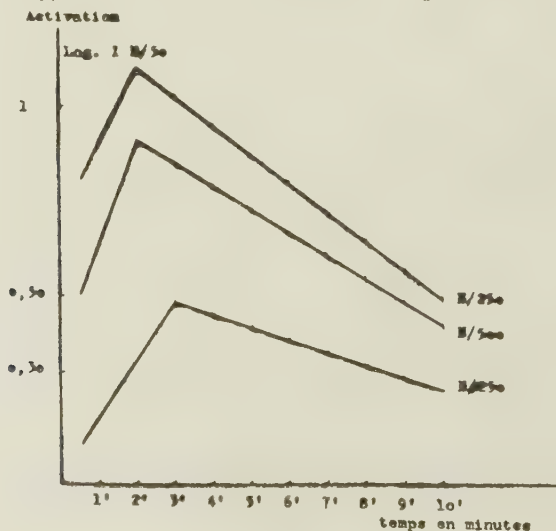


FIGURE 21

TABLEAU IX

*Influence de la concentration en peroxyde
sur l'activité peroxydasique de HbO₂ à pH 4.9*

Dégagement d'I N/10 à chaque intervalle de 2'

Concentration moléculaire du peroxyde	Temps	Témoin	0,2 c/ms HbO ₂ M/2000	Acti- vation	C.A.	Kd
Peroxyde	2	0,25	2,30	2,05	9,2	
N/25	4	»	0,90	0,65	3,6	0,69
—	6	»	0,65	0,35	2,4	0,47
—	8	»	0,56	0,30	2	0,13
—	10	»	0,44	0,20	1,7	0,34
—	12	»	0,41	0,16	1,6	0,20
—	14	»	0,40	0,14	1,6	0,13
—	16	»	0,36	0,11	1,5	0,20
—	18	»	0,34	0,09	1,40	0,18
—	20	»	0,32	0,07	1,15	0,23
Iode total dégagé pendant 20'...				6,68	4,18	2,67
					Kd en moy. = 0,23	
Peroxyde	2	0,125	1,85	1,72	15	
N/50	4	»	0,65	0,53	5,2	0,70
—	6	»	0,48	0,36	4,1	0,32
—	8	»	0,40	0,28	3,30	0,20
—	10	»	0,38	0,26	3,00	0,11
—	12	»	0,30	0,18	2,1	0,28
—	14	»	0,28	0,16	2,2	0,12
—	16	»	0,26	0,14	1,8	0,13
—	18	»	0,21	0,10	1,6	0,29
—	20	»	0,20	0,08	1,5	0,20
Iode total dégagé pendant 20'...				5,05	3,80	4,0
					Kd en moy. = 0,20	

Dégagement d'iode N/10 à chaque intervalle de 2'

Concentration moléculaire du peroxyde	Temps	Témoin	0,2 c/ms HbO ₂ M/2000	Acti- vation	C.A.	K _D
—	—	—	—	—	—	—
Peroxyde	2	0,062	1,40	1,34	22,5	
N/100	4	»	0,42	0,36	7	0,74
—	6	»	0,34	0,28	5,5	0,21
—	8	»	0,29	0,23	4,7	0,18
—	10	»	0,27	0,21	4,3	0,09
—	12	»	0,23	0,17	3,5	0,20
—	14	»	0,21	0,15	3,2	0,11
—	16	»	0,19	0,14	3,1	0,07
—	18	»	0,18	0,12	2,8	0,15
—	20	»	0,17	0,11	2,7	0,09

Iode total dégagé pendant 20'.. 3,60 3,07 6,00 K_D en moy. = 0,14

Concentration moléculaire du peroxyde	Temps	Témoin	0,2 c/ms HbO ₂ M/2000	Acti- vation	C.A.	K _D
—	—	—	—	—	—	—
Peroxyde	2	0,025	0,95	0,92	38	
N/250	4	»	0,40	0,38	16	0,59
—	6	»	0,35	0,32	14	0,16
—	8	»	0,25	0,23	11	0,28
—	10	»	0,23	0,21	9,2	0,09
—	12	»	0,20	0,18	8	0,15
—	14	»	0,17	0,15	7,2	0,17
—	16	»	0,15	0,13	6	0,14
—	18	»	0,12	0,10	5	0,23
—	20	»	0,11	0,09	4	0,10

Iode total dégagé pendant 20'.. 2,93 2,68 11,7 K_D en moy. = 0,16

Concentration moléculaire du peroxyde	Temps	Témoin	0,2 c/ms H ₂ O ₂ M/2000	Acti- vation	C.A.	K _D
Peroxyde	2	0,0125	0,65	0,64	50	
N/500	4	»	0,37	0,36	30	0,44
—	6	»	0,30	0,29	24	0,20
—	8	»	0,27	0,26	21	0,10
—	10	»	0,22	0,21	18	0,16
—	12	»	0,20	0,19	16	0,10
—	14	»	0,18	0,17	14,5	0,10
—	16	»	0,17	0,16	13,6	0,07
—	18	»	0,16	0,15	12,8	0,11
—	20	»	0,15	0,14	12	0,07
Iode total dégagé pendant 20'..			2,67	2,54	22,2	K _D en moy. = 0,12
Peroxyde	2	0,005	0,265	0,260	53	
N/1250	4	»	0,22	0,215	44	0,20
—	6	»	0,18	0,175	36	0,19
—	8	»	0,15	0,145	28	0,10
—	10	»	0,13	0,125	26	0,11
—	12	»	0,12	0,115	23	0,09
—	14	»	0,11	0,105	20	0,07
—	16	»	0,10	0,095	19	0,10
—	18	»	0,09	0,085	18	0,11
—	20	»	0,08	0,075	17	0,12
Iode total dégagé pendant 20'..			1,42	1,37	28	K _D en moy = 0,10
Peroxyde	2	0,002	0,14	0,138	56	
N/2500	4	»	0,11	0,108	47	0,20
—	6	»	0,10	0,098	40	0,11
—	8	»	0,09	0,088	36	0,10
—	10	»	0,09	0,088	33	0,05
—	12	»	0,08	0,078	31	0,07
—	14	»	0,075	0,068	28	0,10
—	16	»	0,07	0,068	26	0,06
—	18	»	0,06	0,058	21	0,09
—	20	»	0,05	0,058	21	0,07
Iode total dégagé pendant 20'..			0,86	0,84	42	K _D en moy. = 0,08

TABLEAU X

*Influence de la concentration du peroxyde sur l'activité
peroxydasique de HbO₂ à pH 5,6*

T = 27° Dégagement I N/10 à chaque minute

Concentration moléculaire du peroxyde	Temps	Témoin	0,2 c/m ₃ HbO ₂ M/5000	Acti- vation	C.A.	$K_D = 1 - \frac{x_1}{x_t}$
Peroxyde	1	1,00	5,60	4,60	5,6	0,40
N/25	2	»	3,60	2,60	3,6	0,56
—	3	»	2,15	1,15	2,2	0,40
—	4	»	1,70	0,70	1,70	0,50
—	5	»	1,35	0,35	1,35	0,43
—	6	»	1,20	0,20	1,20	0,40
—	7	»	1,12	0,12	1,12	0,50
—	8	»	1,06	0,06	1,00	
—	9	»	1,00	0		
—	10	»	1,00			
Iode total dégagé pendant 20'.			19,78	9,78	1,9	K_D en moy. = 0,46
Peroxyde	1	0,50	4,00	3,50	8	
N/50	2	»	3,10	2,60	6,2	
—	3	»	1,85	1,30	3,7	0,48
—	4	»	1,50	1,00	3	0,26
—	5	»	1,15	0,65	2,3	0,35
—	6	»	1,05	0,55	2,1	0,16
—	7	»	0,90	0,40	1,8	0,27
—	8	»	0,75	0,25	1,5	0,38
—	9	»	0,65	0,15	1,3	0,40
—	10	»	0,60	0,10	1,2	0,30
Iode total dégagé pendant 20'.			15,55	10,55	3,1	K_D en moy. = 0,32

Concentration moléculaire du peroxyde	Temps	Témoin	0,2 c/ms HbO ₃ M/5000	Acti- vation	C.A.	$K_D = 1 - \frac{rt_1}{rt}$
Peroxyde	1	0,25	2,65	2,40	10,6	
N/100	2	»	2,35	2,10	9,4	
—	3	»	1,65	1,40	6,6	0,34
—	4	»	1,30	1,05	5,2	0,25
—	5	»	1,05	0,80	4,2	0,24
—	6	»	0,90	0,65	3,6	0,19
—	7	»	0,70	0,45	3	0,30
—	8	»	0,60	0,35	2,4	0,23
—	9	»	0,55	0,30	2,2	0,15
—	10	»	0,50	0,25	2	0,17

Iode total dégagé
pendant 20' . 12,25 9,75 5 K_D en moy.
= 0,23

Peroxyde	1	0,10	0,98	0,88	9,8	
N/250	2	»	1,33	1,23	13,3	
—	3	»	1,18	1,08	11,8	0,13
—	4	»	0,95	0,85	9,5	0,21
—	5	»	0,85	0,75	8,5	0,12
—	6	»	0,72	0,62	7,2	0,18
—	7	»	0,58	0,48	5,8	0,20
—	8	»	0,55	0,45	5,5	0,10
—	9	»	0,46	0,36	4,6	0,20
—	10	»	0,40	0,30	4,0	0,17

Iode total dégagé
pendant 20' . 8,00 7,00 8,0 K_D en moy.
= 0,16

Peroxyde	1	0,05	0,46	0,41	9	
N/500	2	»	0,82	0,77	16,3	
—	3	»	0,71	0,66	14	0,14
—	4	»	0,67	0,62	13,4	0,07
—	5	»	0,56	0,51	11,2	0,18
—	6	»	0,52	0,47	10,4	0,08
—	7	»	0,48	0,43	9,6	0,09
—	8	»	0,42	0,37	8,4	0,14
—	9	»	0,38	0,33	8	0,11
—	10	»	0,30	0,25	6	0,24

Iode total dégagé
pendant 20' . 5,32 4,82 10,6 K_D en moy.
= 0,13

Concentration moléculaire du peroxyde	Temps	Témoin	0,2 c/m ₃ HbO ₃ M/5000	Acti- vation	C.A.	$K_D = 1 - \frac{x_t}{x_t}$
Peroxyde	1	0,02	0,13	0,11	6,5	
N/1250	2	»	0,28	0,26	14	
—	3	»	0,31	0,29	15,5	
—	4	»	0,29	0,27	14,5	0,07
—	5	»	0,27	0,25	13,5	0,08
—	6	»	0,26	0,24	13	0,04
—	7	»	0,24	0,22	12	0,09
—	8	»	0,22	0,20	11	0,10
—	9	»	0,21	0,19	10,5	0,05
—	10	»	0,20	0,18	10	0,10

Iode total dégagé pendant 20' ..					2,41	2,21	12	K _D en moy. = 0,07
-------------------------------------	--	--	--	--	------	------	----	----------------------------------

Concentration moléculaire du peroxyde	Temps	Témoin	0,2 c/m ₃ HbO ₃ M/2000	Acti- vation	C.A.	$K_D = 1 - \frac{x_t}{x_t}$
Peroxyde	1	0,01	0,04	0,03	4	
N/2500	2	»	0,12	0,11	12	
—	3	»	0,20	0,19	20	
—	4	»	0,18	0,17	18	0,10
—	5	»	0,17	0,16	17	0,06
—	6	»	0,16	0,15	16	0,06
—	7	»	0,15	0,14	15	0,07
—	8	»	0,14	0,13	14	0,07
—	9	»	0,13	0,12	13	0,08
—	10	»	0,12	0,11	12	0,11

Iode total dégagé pendant 20' ..					1,41	1,31	14,1	K _D en moy. = 0,08
-------------------------------------	--	--	--	--	------	------	------	----------------------------------

3° Variation de la concentration de l'hémoglobine en présence des quantités constantes de peroxyde

La première constatation qui ressort des tableaux XI est que, comme l'indique WILLSTAETTER, l'activation du peroxyde n'est pas proportionnelle à la concentration de l'hémoglobine (fig. 22). Nous verrons plus loin que l'ascension observée est celle d'une courbe logarithmique.

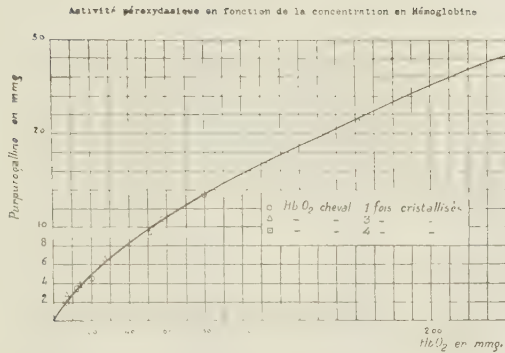


FIGURE 22

Activité peroxydasique en fonction de la concentration en Hémoglobine.
(D'après R. WILLSTATTER et A. POLLINGER).

L'activité de HbO_2 ne dépend pas du degré de purification de l'hémoglobine et reste identique, que l'on emploie de l'hémoglobine de sang laqué ou de l'hémoglobine quatre fois recristallisée.

Le rapport des activations à 2' et à 20' est sensiblement constant et voisin de 1,5 ce qui signifie qu'après 20 minutes, il reste en solution une quantité d'hémoglobine qui représente environ 25 % de la quantité initiale.

*Activité peroxydasique en fonction
de la concentration en HbO_2*

1 N/50 dégagé après
2' - 6' - 12'

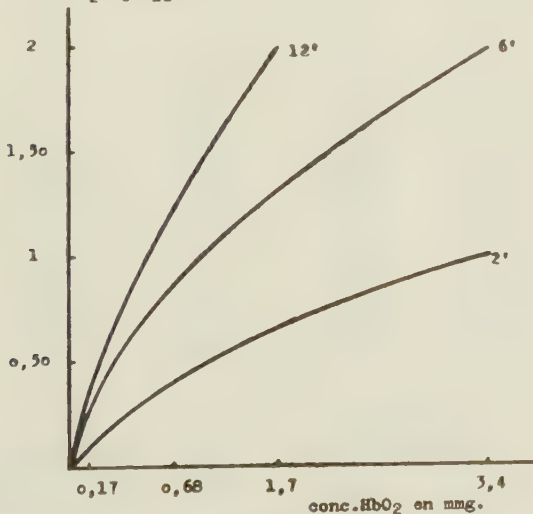


FIGURE 23

TABLEAU XI

Variation de la concentration de HbO_2 en présence de quantités constantes de peroxyde

Dégagement d'I N/50 à chaque intervalle de 2 minutes

	Temps	Témoin	0,2 c/ms HbO_2 M/1000	Activation	C.A.
HbO_2	2	0,06	5,00	4,94	82
M/1000	4	»	2,65	2,59	44
—	6	»	2,36	2,30	39
—	8	»	2,05	1,99	31
—	10	»	1,80	1,74	29
—	12	»	1,65	1,59	27
—	14	»	1,50	1,44	25
—	16	»	1,40	1,34	23
—	18	»	1,31	1,25	21
—	20	»	1,10	1,04	18
Iode dégagé pendant 20'			20,80	20,20	34

Dégagement d'I N/50 à chaque intervalle de 2 minutes

	Temps	Témoin	0,2 c/ms HbO_2 M/2000	Activation	C.A.
HbO_2	2	0,06	3,25	3,19	54
M/2000	4	»	1,86	1,80	31
—	6	»	1,50	1,44	25
—	8	»	1,36	1,30	23
—	10	»	1,20	1,14	20
—	12	»	1,00	0,94	16
—	14	»	0,90	0,84	15
—	16	»	0,85	0,79	14
—	18	»	0,80	0,74	13,3
—	20	»	0,76	0,70	12,6
Iode dégagé pendant 20'			13,35	12,75	22,2

	Temps	Témoin	0,2 c/ms HbO ₂ M/4000	Activation	C.A.
HbO ₂	2	0,06	1,90	1,88	31,6
M/4000	4	»	1,15	1,09	19
—	6	»	0,96	0,90	16
—	8	»	0,85	0,79	14
—	10	»	0,78	0,72	13
—	12	»	0,74	0,68	11,3
—	14	»	0,65	0,59	10
—	16	»	0,58	0,52	8,6
—	18	»	0,52	0,56	7,6
—	20	»	0,46	0,40	7
Iode dégagé pendant 20'	0,60		8,59	8,00	14,3

	Temps	Témoin	0,2 c/ms HbO ₂ M/5000	Activation	C.A.
HbO ₂	2	0,06	1,40	1,34	23,3
M/5000	4	»	1,05	0,99	17,5
—	6	»	0,90	0,84	15
—	8	»	0,70	0,64	11,6
—	10	»	0,62	0,56	10,3
—	12	»	0,56	0,50	9,3
—	14	»	0,50	0,44	8,3
—	16	»	0,43	0,37	7
—	18	»	0,37	0,31	6
—	20	»	0,33	0,27	5,5
Iode dégagé pendant 20'	0,60		6,75	6,15	11,2

	Temps	Témoin	$\frac{0,2 \text{ c/ms}}{\text{HbO}_2 \text{ M/6000}}$	Activation	C.A.
HbO ₂	2	0,06	1,30	1,24	21,6
M/6000	4	»	0,90	0,84	15
—	6	»	0,78	0,72	13
—	8	»	0,66	0,60	11
—	10	»	0,57	0,51	9,5
—	12	»	0,46	0,40	7,6
—	14	»	0,40	0,34	6,6
—	16	»	0,36	0,30	6
—	18	»	0,31	0,25	5,1
—	20	»	0,26	0,20	4,3

Iode dégagé pendant 20'	0,60	5,85	5,15	9,7
----------------------------	------	------	------	-----

	Temps	Témoin	$\frac{0,2 \text{ c/ms}}{\text{HbO}_2 \text{ M/8000}}$	Activation	C.A.
HbO ₂	2	0,06	0,96	0,90	16
M/8000	4	»	0,75	0,69	12,5
—	6	»	0,62	0,54	10,3
—	8	»	0,48	0,42	8
—	10	»	0,40	0,34	6,6
—	12	»	0,33	0,27	5,5
—	14	»	0,30	0,24	5
—	16	»	0,28	0,22	4,6
—	18	»	0,25	0,19	4
—	20	»	0,20	0,14	3,3

Iode dégagé pendant 20'	0,60	4,50	3,90	7,5
----------------------------	------	------	------	-----

Dégagement d'Iode N/50 à chaque intervalle de 2 minutes

	Temps	Témoin	0,2 c/ms HbO ₂ M/10000	Activation	C.A.
HbO ₂	2	0,06	0,90	0,84	15
M/10000	4	»	0,65	0,59	11
—	6	»	0,50	0,44	8,3
—	8	»	0,46	0,40	7,6
—	10	»	0,37	0,31	6,1
—	12	»	0,32	0,26	5,3
—	14	»	0,27	0,21	4,5
—	16	»	0,24	0,18	4
—	18	»	0,22	0,16	3,6
—	20	»	0,20	0,14	3,3

Iode dégagé pendant 20'	0,60	4,05	3,45	6,7
----------------------------	------	------	------	-----

	Temps	Témoin	0,2 c/ms HbO ₂ M/12000	Activation	C.A.
HbO ₂	2	0,06	0,76	0,70	12,7
M/12000	4	»	0,57	0,51	9,5
—	6	»	0,48	0,42	8
—	8	»	0,38	0,32	6,3
—	10	»	0,32	0,26	5,3
—	12	»	0,27	0,21	4,5
—	14	»	0,25	0,19	4,1
—	16	»	0,22	0,16	3,7
—	18	»	0,20	0,14	3,3
—	20	»	0,18	0,12	3

Iode dégagé pendant 20'	0,60	3,50	2,90	5,8
----------------------------	------	------	------	-----

	Temps	Témoin	$\frac{0,2 \text{ c/m}_3}{\text{HbO}_2 \text{ M/14000}}$	Activation	C.A.
HbO ₂	2	0,06	0,63	0,57	10,5
M/14000	4	»	0,53	0,47	9
—	6	»	0,36	0,30	6
—	8	»	0,31	0,25	5,1
—	10	»	0,28	0,22	4,7
—	12	»	0,24	0,18	4
—	14	»	0,22	0,16	3,7
—	16	»	0,20	0,14	3,3
—	18	»	0,17	0,11	2,8
—	20	»	0,15	0,09	2,5

Iode dégagé pendant 20'	0,60	3,04
----------------------------	------	------

	Temps	Témoin	$\frac{0,2 \text{ c/m}_3}{\text{HbO}_2 \text{ M/16000}}$	Activation	C.A.
HbO ₂	2	0,06	0,56	0,50	9,3
M/16000	4	»	0,44	0,38	7,3
—	6	»	0,35	0,29	6
—	8	»	0,30	0,24	5
—	10	»	0,26	0,20	4,3
—	12	»	0,23	0,17	4
—	14	»	0,20	0,14	3,3
—	16	»	0,18	0,12	3
—	18	»	0,15	0,09	2,5
—	20	»	0,13	0,07	2,1

Iode dégagé pendant 20'	2,72
----------------------------	------

	Temps	Témoin	0,2 c/ms HbO ₂ M/18000	Activation	C.A.
HbO ₂	2	0,06	0,48	0,42	8
M/18000	4	»	0,45	0,39	7,5
—	6	»	0,34	0,28	5,7
—	8	»	0,30	0,24	5,0
—	10	»	0,25	0,19	4,1
—	12	»	0,22	0,16	3,7
—	14	»	0,20	0,14	3,3
—	16	»	0,18	0,12	3,0
—	18	»	0,15	0,09	2,5
—	20	»	0,12	0,06	2

Iode dégagé pendant 20'	0,60	2,69	2,09
----------------------------	------	------	------

	Temps	Témoin	0,2 c/ms HbO ₂ M/20000	Activation	C.A.
HbO ₂	2	0,06	0,39	0,33	7,0 (6,5)
M/20000	4	»	0,35	0,29	5,8
—	6	»	0,30	0,24	5
—	8	»	0,26	0,20	4,3
—	10	»	0,22	0,16	3,6
—	12	»	0,19	0,13	3,1
—	14	»	0,17	0,11	2,8
—	16	»	0,14	0,08	2,3
—	18	»	0,13	0,07	2,1
—	20	»	0,11	0,05	1,8

Iode dégagé pendant 20'	0,60	2,26	1,66
----------------------------	------	------	------

2° INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

a) Sur la vitesse de la réaction.

La figure 14 montre qu'il existe dans les réactions de per-

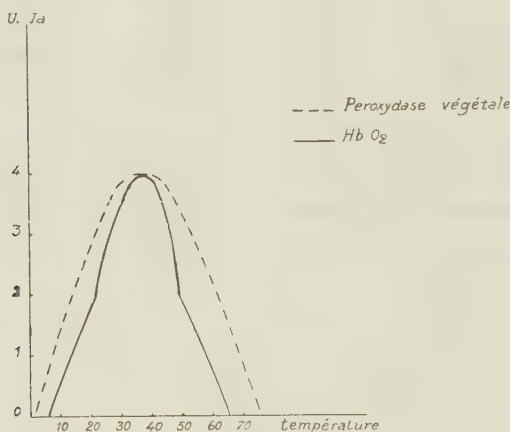


FIGURE 24
Température optimum (Jayle).

oxydation catalysées par l'hémoglobine, un optimum très précis de température situé entre 30 et 40°. A 37°, l'activité catalytique de l'hémoglobine est deux fois plus grande qu'à 23°, alors que celle de la peroxydase végétale n'a augmenté que de 50 %. Au-dessus de 40°, la vitesse de la réaction diminue très rapidement avec l'hémoglobine et s'annule au-dessus de 50°. On peut cependant atteindre 80 à 90° sans détruire complètement le catalyseur, car, après refroidissement, la solution d'hémoglobine donne encore des réactions positives avec les réactifs de WEBER et de MEYER. Mais il s'agit là d'une action peroxydante en rapport avec l'hématine non détruite et non d'une action enzymatique qui n'est pas régénérée par refroidissement, car U.I.a. après chauffage a perdu 80 à 90 % de sa valeur initiale.

b) *Influence de la température sur la destruction de l'hémoglobine.*

Au cours des expériences suivantes (tabl. XII), nous nous sommes proposé de rechercher l'effet de la température sur la destruction de l'hémoglobine pendant la réaction peroxydasique.

Dans ce but, on emploie la technique habituelle et on poursuit le dosage pendant 30 minutes en présence de 2 cm³ de peroxyde N/50 que l'on introduit en deux fois : à 0' et à 15'. A cette dilution, on constate que l'activité catalytique du pigment est identique dans les deux phases de la réaction quand on opère à 22°. Le tableau XII met en parallèle les quantités d'iode dégagé de 2 minutes en 2 minutes par la réaction précédente, avec celles qui sont libérées par une réaction conduite de la même façon, mais à une température de 42° pendant les 10 premières minutes, et de 22°, de 15' à 30'. On observe à 2' que la réaction est deux fois plus rapide à 42° qu'à 22°, mais au cours des dosages successifs, les chiffres s'inversent, ce qui s'explique en partie par la chute de la concentration du peroxyde. La réaction catalytique s'arrête pratiquement dans les deux cas, au chiffre de 1 cc. 72 d'iode N/100, ce qui met en évidence l'existence d'un seuil de concentration au-dessous duquel le peroxyde n'est plus activé par le catalyseur. En effet, la libération du dernier 0 cm³ 28 nécessite autant de temps que celle d'une solution témoin sans hémoglobine.

Cet arrêt permet de refroidir la capsule n° 2 entre 10' et 15' et durant le 2^e temps après addition du deuxième cm³ de peroxyde, de faire la comparaison des activités catalytiques des deux solutions.

On note (tabl. n° XII) que la quantité d'iode libéré, de 15' à 17', est pour la première capsule de 0,54, et pour la deuxième de 0,26 seulement.

C'est donc un résultat inversé par rapport au précédent. Alors que 1,78 cm³ d'iode N/100 sont libérés dans le premier cas en 30'; dans le second cas le chiffre est de 0,98.

Cette expérience prouve que l'effet destructeur du peroxyde est lié à la température de la réaction et est d'autant plus importante que celle-ci est plus élevée.

TABLEAU XII

Effet de la température sur la destruction de HbO_2

Temps	22° I. N/100	42° I. N/100
2'	0,46	1,05
4'	0,90	1,45
6'	1,18	1,56
8'	1,40	1,72
10'	1,55	La solution est refroidie à 22° + 1 cm ³ perox. N/50
15'	1,72	
+ 1 cm ³ peroxyde N/50		22°
17'	0,54	0,26
19'	0,94	0,46
21'	1,20	0,73
23'	1,43	0,80
25'	1,57	0,87
30'	1,78	0,98

On peut, grâce aux résultats obtenus au cours de ces différents essais, établir les conditions expérimentales dans lesquelles il faut se placer pour mesurer le *pH* optimum réel de l'action peroxydasique d'un type donné d'hémoglobine.

En opérant avec la méthode décrite page 63, employer :

1° 2 cm³ de peroxyde N/20, soit une concentration en peroxyde de N/1000.

2° 5 cm³ d'une solution d'iodure de potassium normale (166 gr. par litre).

3° La température doit être aussi basse que possible, comprise entre 10° et 15°, et maintenue constante pendant toute la durée de la réaction.

4° Il ne faut tenir compte que des dégagements d'iode obtenus pendant les 2 ou 3 premières minutes.

5° Opérer d'une façon toujours identique en agitant la solution contenant l'hémoglobine, l'iodure et l'eau de dilution, et en ajoutant d'un seul coup, au moment de la mise en

marche du chronomètre, le mélange du peroxyde et de la solution tamponnée.

6° Enfin, la quantité d'hémoglobine employée doit être de l'ordre de $0,2 \text{ cm}^3$ d'hémoglobine M/5000, soit 0,62 mg.

De cette façon, on est assuré de déterminer très exactement le pH optimum de l'hémoglobine considérée en éliminant au maximum tous les facteurs de destruction.

7° Il est préférable de remplacer la solution d'hyposulfite de titration par une solution d'acide ascorbique titrée au pH indiqué, par une solution d'iode, en raison du léger effet inhibiteur occasionné par le tétrathionate.

d) *Comparaison de l'action catalytique des peroxydases végétales, de la myohémoglobine et de l'hémoglobine.*

Nous avons souvent mis en parallèle l'activité catalytique de l'hémoglobine avec celle des peroxydases végétales. Nous allons grouper ici les différentes données établies.

1° La peroxydase végétale est beaucoup plus résistante que l'hémoglobine à l'action oxydante du peroxyde. Le diagramme représentatif de son activité est linéaire, alors qu'il a une forme parabolique avec le protéide sanguin.

2° Son activité est proportionnelle à la quantité de peroxydase mise en jeu, ce qui ne se produit pas avec l'hémoglobine.

3° La spécificité marquée des peroxydases pour H_2O_2 en fait des hydroperoxydases. L'hémoglobine entre plutôt dans le sous-groupe des hydroalcoyloperoxydases.

4° On observe avec la peroxydase, en fonction de la concentration en peroxyde, une courbe en cloche caractéristique à partir de laquelle on peut déterminer son affinité par la mesure de la constante de MICHAELIS. Au contraire, le pouvoir inhibiteur du substrat n'existe pas avec l'hémoglobine dont l'activité catalytique est d'autant plus grande que le peroxyde est plus concentré.

5° L'hémoglobine oxyde directement l'acide ascorbique, ce qui n'est pas le cas de la peroxydase où un intermédiaire (flavone, acide iodhydrique) est indispensable.

6° La cinétique de la réaction n'est nullement modifiée, pour la peroxydase, par la présence de réducteurs doux (acide ascorbique, glutathion, cystéine), contrairement à ce qui se passe avec l'hémoglobine. Par contre, avec les réducteurs forts (hydrosulfite, sulfite), les modifications sont les mêmes dans les deux cas.

7° La présence d'iode exerce vis-à-vis de l'hémoglobine un effet inhibiteur qui n'est pas observé avec la peroxydase. Aussi les chiffres d'iode obtenus exprimant l'activité de l'hémoglobine sont-ils fort différents si on réduit l'iode au fur et à mesure de sa libération ou si l'on titre l'iode dégagé après 5 minutes. Il ne s'agit pas d'une destruction, mais d'une simple inhibition.

8° Enfin, la spécialisation enzymatique est beaucoup plus grande dans le cas des peroxydases végétales.

Tous ces caractères différentiels prouvent que l'hémoglobine est un catalyseur incomplet de peroxydation. A ce sujet, M.-F. JAYLE a établi que le complément de son activité pouvait être le substrat lui-même. C'est le cas de l'acide ascorbique. Un effet complémentaire semblable peut être fourni, comme nous le verrons, par une matière protéique dont la copulation avec HbO_2 donne à la cinétique de son action catalytique la même allure que celle d'une peroxydase végétale.

9° Les courbes d'activité de différentes hémoglobines établies, en maintenant constante la quantité de peroxyde et en faisant varier la concentration du catalyseur, sont à interpréter comme des isothermies d'adsorption (W. WILLSTAETTER et POLLINGER, 85).

Il en est de même si l'on fait varier la quantité de peroxyde en maintenant constante la concentration en hémoglobine.

Le partage du peroxyde entre les particules d'hémoglobine et la solution se fait identiquement dans tous les cas.

Par contre, les différentes hémoglobines n'ont pas la même activité peroxydasique, comme le montrent les chiffres du tableau XIII empruntés, les P.Z. à R. WILLSTAETTER et les U.I. à M.-F. JAYLE.

85) R. WILLSTAETTER et POLLINGER A. - 1922/23 - 480 - 269 ; A. 1926 - 449 - 156 ; l. c. n° (p. 489 - T. I.).

TABEAU XIII

Activités peroxydasiques de différentes hémoglobines exprimées en PZ, en U.I.a et en U.I.

1 mg. HbO ₂	PZ (1) H ₂ O ₂	U.I.a	U.I.
		C ₂ H ₈ OOH	C ₂ H ₈ OOH
Homme		1,8 à 2	0,75
Singe		2	0,75
Cheval	0,152	4,7	2,5
Bœuf	0,114	4,5	2,5
Veau		4,6	2,4
Porc	0,093	4,3	2,3
Mouton		2,6	1,75
Lapin		3	1,14
Cobaye		2,94	1,7
Chien	0,115	2,4	1
Coq		2,55	1,14

Les différences observées ici sont en rapport avec le support protéique, dont la constitution est différente suivant l'hémoglobine (Jean ROCHE).

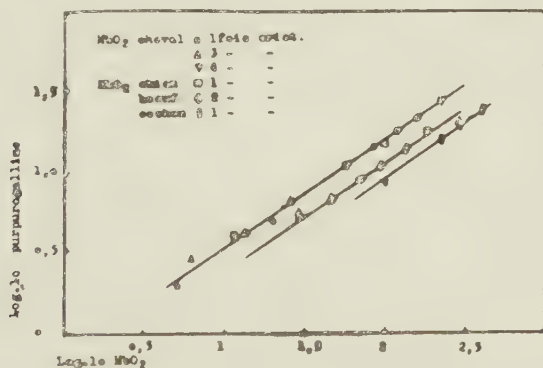


FIGURE 25

*Log. de l'activité catalytique en fonction du log. de HbO₂
d'après R. WILLSTAETTER et A. POLLINGER*

La fig. 25 empruntée au travail de R. WILLSTAETTER et A. POLLINGER est une représentation logarithmique de la fig. 22. Elle met en évidence, ainsi que le tableau XIV, que le partage de l'eau oxygénée entre la solution et le pigment sanguin est régie par la même loi pour différentes hémoglobines.

Nous avons traduit nos résultats de la même façon en exprimant logarithmiquement l'activité de l'hémoglobine pendant les deux premières minutes de l'activation. Le diagramme obtenu est une droite (fig. 26) et confirme ceux de WILLSTAETTER et POLLINGER.

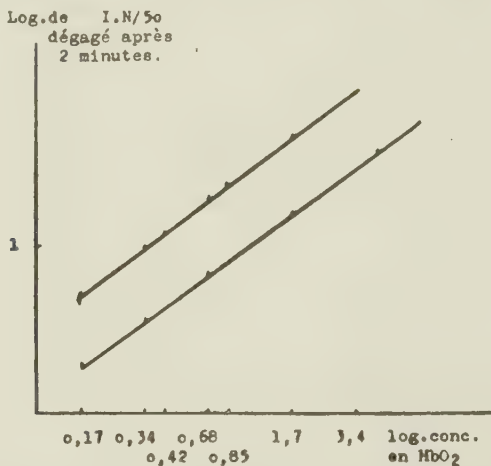


FIGURE 26

Log. de l'activité de HbO₂ en fonction du log. de la concentration de HbO₂

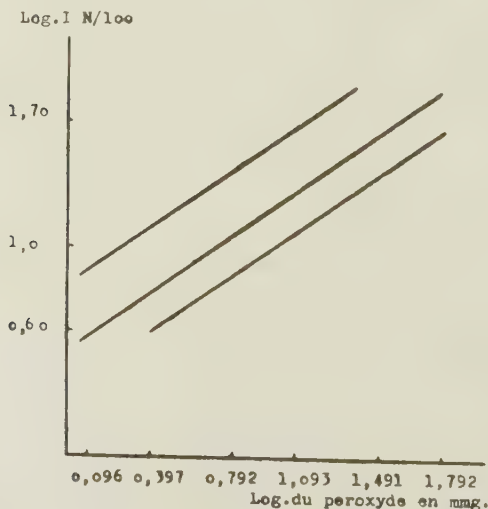


FIGURE 27

Log. de l'activité de HbO₂ en fonction du log. des concentrations du peroxyde

TABLEAU XIV

a) HbO_2 cheval constante (WILLSTAETTER et POLLINGER)

H_2O_2 mg. log.	Purpurogalline mg. log.	Différence pour H_2O_2 1 : 2	Moyenne
1,398	0,972	0,213	0,201
1,699	1,185	0,199	
2,000	1,384		
2,301	1,574	0,190	

b) H_2O_2 constant (WILLSTAETTER et POLLINGER)

H_2O_2 mg. log.	Purpurogalline mg. log.	Différence pour H_2O_2 1 : 2	Moyenne
0,702	0,301	0,196	0,200
1,304	0,694		
1,906	1,131	0,218	
2,207	1,3192	0,188	

La myohémoglobine

Nous avons modifié légèrement la technique de préparation de WASTON en traitant l'extrait musculaire par du toluène avant son adsorption sur du silicate colloïdal.

Comme l'hémoglobine, la myohémoglobine active davantage les hydroperoxydases d'alcyle que l'eau oxygénée.

Le pH optimum est également identique. Quand on prend des solutions de HbO_2 et de myohémoglobine de même activité, on trouve les mêmes activations en fonction du pH. Enfin, le coefficient de destruction s'avère rigoureusement identique dans les deux cas. C'est pourquoi il nous a paru inutile de donner les tableaux de nos résultats.

ETUDE MATHEMATIQUE DES COURBES D'ACTIVITE DE L'HEMOGLOBINE

Les courbes d'activité s'expriment par l'équation des isothermes d'adsorption établie par H. FREUNDLICH (86).

$$a = \frac{1}{1 + c^n}$$

L'exposant n obtenu par WILLSTAETTER à partir des tableaux que nous reproduisons (tableau XV) donne une valeur moyenne de 0,200 quelle que soit l'hémoglobine; calculé à partir de nos résultats, $1/n$ est également voisin de 0,2 (tableau XV).

En résumé, l'affinité d'une peroxydase végétale à l'égard du peroxyde se traduit par la courbe de MICHAELIS et sa constante se calcule à partir de la concentration du substrat qui donne 50 % de l'activité maximum.

Avec l'hémoglobine, l'affinité suit les lois d'adsorption et se traduit par le coefficient $1/n$.

C'est la différence fondamentale qui distingue l'action catalytique des enzymes de peroxydation végétaux et animaux quand on a éliminé le facteur destruction par un choix approprié du substrat et des conditions expérimentales.

TABLEAU XV

*Variation de la concentration de l'HbO₂ en présence
de quantités constantes de peroxyde*

HbO ₂ (en mgr.) Log.	Iode mg. Log.	1/n calculé à partir de HbO ₂ 1 : 2	1/n moyenne
1,53148	1,70757		
1,23045	1,51851	0,189	
0,92942	1,29663	0,222	
0,6289	1,06819	0,228	0,22
0,83251	1,23045		
0 53148	1,01703	0,213	
0,23045	0,70586	0,299	

(86) H. FREUNDLICH. Kapillarchimie - 2 Aufl. Leipzig 1932. Abschluss A. 4.

Influence de la concentration en peroxyde

C ₂ H ₅ OOH (en mgr.) Log. —	Iode mg. Log. —	1/n calculé à partir de C ₂ H ₅ OOH 1 : 2 —	1/n moyenne —
1,7923	1,67210		
1,49136	1,55023	0,13	
1,09342	1,38021		
0,7923	1,22148	0,165	0,186
0,39794	0,81959		
0,09691	0,54407	0,275	

CHAPITRE III

ETUDE DE L'HAPTOGLOBINE

I. — PRÉSENCE DANS LE PLASMA SANGUIN D'UN PRINCIPE ACTIVANT L'ACTION CATALYTIQUE DE L'HÉMOGLOBINE

M. POLONOVSKI et M.-F. JAYLE (page 34) ont mis en évidence, dans le plasma sanguin de sujets malades la présence d'un activateur de l'action catalytique de l'hémoglobine en procédant de la manière suivante :

On introduit dans une capsule, 0,2 cm³ d'hémoglobine d'homme M/2000, soit 1,7 mg que l'on mélange à 0,1 cm³ de plasma oxalaté pathologique.

Le dosage est conduit comme il est indiqué page 62 en employant des solutions tamponnées à différents *pH* (3 à 5,8). L'iode libéré est titré au bout de 4'30" par de l'hyposulfite N/100 et le dosage terminé exactement à 5 minutes. On fait simultanément trois dosages au même *pH*, l'un sans catalyseur, le deuxième avec 0,1 cm³ de plasma, le 3^e avec le mélange hémoglobine-plasma. Le tableau XVI représente les résultats obtenus.

TABLEAU XVI

*pH optimum de l'activation catalytique de HbO₂
par le plasma d'homme*

Plasma HbO ₂ (1mg. 7)	I. N/100 libéré pendant 5 minutes par				Activation rapportée à 0,1 cm ³ de plasma (U.I.)
	0,1 cm ³ 0 cm ³	0 cm ³ 0,2 cm ³	0,1 cm ³ 0,2 cm ³	0 0 Témoin	
<i>pH</i> 3	0,7	0,15	2	0,15	1,3
<i>pH</i> 3,7	0,5	0,45	3,3	0,15	2,5
<i>pH</i> 4,1	0,1	0,60	4	0,12	3,1
<i>pH</i> 4,4	0,4	0,70	4,4	0,12	3,4
<i>pH</i> 4,8	0,3	0,90	2,9	0,10	1,8
<i>pH</i> 5,2	0,3	1,20	1,5	0,10	0,1
<i>pH</i> 5,8	0,2	1,40	1,5	0,10	0

L'activation est calculée, en retranchant de la quantité d'iode dosée correspondant à chacun des systèmes, celle qui est libérée par le témoin sans catalyseur (0,15 cm³ I N/100) et l'on soustrait du chiffre obtenu avec le mélange plasma-hémoglobine, la somme des chiffres exprimant séparément l'activité du plasma et celle de l'hémoglobine. On ramène toujours, par le calcul, l'activation à 0,1 cm³ de plasma, que l'on prenne des quantités de plasma supérieures ou inférieures à 0,1 cm³.

La dernière colonne du tableau XVI indique le résultat de ce calcul qui traduit l'activation de HbO₂ par le plasma. Le pH optimum de celle-ci, dans les conditions expérimentales employées, est 4,4. A ce pH l'activité peroxydasique de 1,7 mgr. d'hémoglobine est multipliée par un coefficient qui varie du simple au décuple selon les plasmas utilisés (tableau XVII).

TABLEAU XVII

Présence dans le plasma sanguin de l'homme d'une substance activant l'action peroxydasique de HbO₂

Plasma HbO ₂ M/2000	I. N/100 libéré pendant 5 minutes par				Activation rapportée à 0,1 cm ³ de plasma
	0,1 cm ³ 0 cm ³	0 cm ³ 0,2 cm ³	0,1 cm ³ 0,2 cm ³	0 (Témoin)	
Plasma A....	0,15	0,6	1,10	0,15	0,50
Plasma B....	0,22	»	1,62	»	
Plasma C....	0,30	»	3,85	»	3,10
Plasma D....	0,35	»	3,15	»	2,35
Plasma E....	0,15	»	0,70	»	0,10

Dans les conditions expérimentales décrites, la quantité d'hémoglobine utilisée a été fixée à 1,7 mgr., car c'est à cette concentration que l'activation est la plus importante. Le tableau XVIIIa) montre que quand on passe de 0,42 mgr. d'hémoglobine à 0,85 et à 1,7 mgr., l'activation est respectivement 1,05, 1,90, 2,85, chiffres qu'elle ne dépasse pratiquement pas pour des quantités plus grandes d'hémoglobine.

Le tableau XVIIIb) indique que si l'on maintient constante

la concentration en HbO_2 , en faisant varier les quantités de plasma, l'activation rapportée à $0,1 \text{ cm}^3$ de plasma est la même pour les 2 premiers chiffres et diminue ensuite régulièrement en fonction des quantités croissantes de plasma.

Il est donc nécessaire, pour mesurer, par cette méthode, l'activation de l'action catalytique de HbO_2 par le plasma, d'utiliser des quantités d'autant plus faibles de plasma que celui-ci contient plus de principe activateur : les plasmas forts doivent être dilués.

TABLEAU XVIII

Activateur du plasma

a) Variation de la quantité d' HbO_2

I. N/100 libéré pendant 5 minutes par				
HbO_2 M/2000	0,1 cm^3 plasma	HbO_2 M/2000	0,2 cm^3 plasma + HbO_2 M/2000	Activation (U.I.) rapportée à 0,1 cm^3 plasma
—	—	—	—	—
0,05	0,5	0,30	1,50	1,05
0,10	—	0,50	2,45	1,90
0,20	—	0,65	3,65	2,85
0,30	—	0,72	3,72	2,85
0,40	—	0,78	3,90	2,95
0,50	—	0,84	3,95	2,95
0,60	—	0,95	4,00	2,90

b) Variation de la quantité de plasma

I N/100 libéré pendant 5 minutes par					
Plasma en cm^3	0,x cm^3 plasma	0,2 cm^3 HbO_2 M/2000	0,2 cm^3 HbO_2 M/2000 0,x cm^3 plasma	Activation (U.I.)	Activation par 0,1 cm^3 de plasma
—	—	—	—	—	—
0,05	0,20	0,9	2,	1,05	2,10
0,10	0,20	—	3,05	2,10	2,10
0,20	0,27	—	4,42	3,40	1,70
0,30	0,32	—	5,45	4,35	1,45
0,40	0,35	—	6,40	5,30	1,30
0,50	0,40	—	6,95	5 80	1,16

Cette activation plasmatique peut être mise en évidence avec toutes les hémoglobines, quelle que soit leur origine.

II. — ETUDE SYSTÉMATIQUE ET PRÉPARATION DE L'ACTIVATEUR PLASMATIQUE

Nous avons étudié l'activation de l'hémoglobine cristallisée de cheval par le plasma humain; nous présentons l'ensemble des résultats obtenus.

Le premier fait qui en ressort est que l'activation de l'hémoglobine de cheval par 0,1 cm³ de plasma est sensiblement le double de celle que l'on obtient avec le chromoprotéide humain. Alors que dans les conditions expérimentales précitées, l'activation par HbO₂ humaine est maximum avec 0,2 cm³ HbO₂ M/2000, celle que l'on trouve avec HbO₂ cheval est maximum avec 0,1 cm³ HbO₂ M/5000 (tableaux XIX et XX).

TABLEAU XIX

Augmentation de l'activité catalytique des hémoglobines d'homme et de cheval par différents plasmas, exprimée en U.I. et rapportée à 0,1 cm³ de plasma

0,2 cm³ HbO₂ homme M/20.000 :

1,80 3,15 1,62 1,24 0,98 2,28 1,60 2,12 1,72 0,72

U.I. homme. Moyenne : 1,723

0,2 cm³ HbO₂ cheval M/5.000 :

3,90 5,55 3,15 2,92 1,90 4,47 3,50 4,20 3,18 1,38

U.I. cheval. Moyenne : 3,415

U.I. cheval

Rapport ——— ——— — :

U.I. homme

2,16 1,76 1,94 2,35 1,92 1,96 2,18 1,28 1,86 1,91

U.I. cheval

————— . Moyenne : 2

U.I. homme

TABLEAU XX

Augmentation de l'activité catalytique de l'hémoglobine à différentes concentrations par une quantité fixe de plasma

Concentration de HbO ₂	I. N/100 dégagé pendant 5' par HbO ₂ + 0.1 cm ³ plasma	I. N/100 dégagé pendant 5' par HbO ₂	Activation de HbO ₂ par 0,1 cm ³ plasma
M/80.000	0,27	0,14	0,15
M/60.000	0,39	0,16	0,23
M/50.000	0,43	0,18	0,25
M/40.000	0,53	0,21	0,33
M/30.000	0,72	0,26	0,46
M/20.000	1,05	0,37	0,68
M/10.000	1,38	0,57	0,81
M/5.000	1,75	0,80	0,95
M/1.000	2,49	1,51	0,96

Si le même protocole expérimental est appliqué à une solution d'hémoglobine de cheval beaucoup plus diluée, les résultats sont très différents.

Le tableau XXI indique l'activation de 0,2 cm³ HbO₂ M/20.000 par les quantités croissantes de plasma (0.05 cm³ à 0,5 cm³). Les chiffres de la deuxième colonne représentant l'activité peroxydasique du mélange HbO₂ - plasma ne sont pas proportionnels entre eux. Par contre, si de chacun d'eux on retranche l'iode libéré par la réaction en présence d'hémoglobine seule (0.55 cm³) on obtient, comme le montre la 3^e colonne, un accroissement presque linéaire de l'activité entre 0,05 cm³ de plasma et 0,18 cm³.

TABLEAU XXI

Activité peroxydasique du mélange HbO_2 - Plasma en fonction de quantités croissantes de plasma

Quantité de plasma dilué en cm^3	I. N/100 libéré par HbO_2 M/20.000 - Plasma	Activation plasmatique
	0,55	
0,05	0,8	0,25
0,11	1,1	0,55
0,15	1,35	0,80
0,18	1,60	1,05
0,20	1,60	1,05
0,25	1,58	1,03
0,30	1,56	1,01
0,5	1,48	0,93

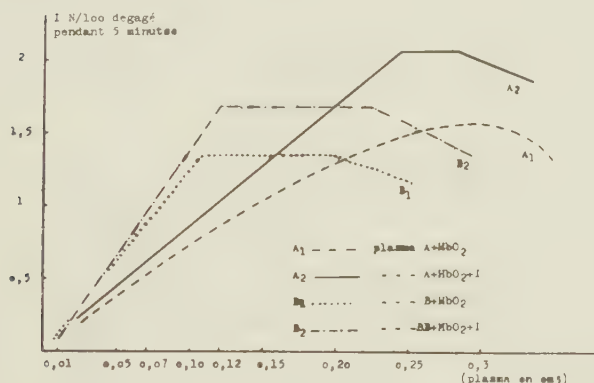


FIGURE 28

Activité peroxydasique de l'hémoglobine en fonction des quantités croissantes de plasma sanguin

Au-dessus de $0,18\text{ cm}^3$, les chiffres diminuent régulièrement de $1,05$ à $0,93\text{ cm}^3$. La fig. 28 représente le diagramme de l'activation de HbO_2 par 2 plasmas différents (A et B). Il est ascendant jusqu'à un plateau qui se raccorde à une ligne descendante. Le commencement du plateau indique la saturation de $0,2\text{ cm}^3$ de HbO_2 M/20.000 par le plasma activateur. Le plasma (B) très activant, présente une saturation très

précise pour 0,108 de plasma. Il est par contre difficile de situer exactement la saturation du plasma (A) peu actif à cause de la forme curvilique de son diagramme, elle est comprise entre 0,25 cm³ et 0,3 cm³.

Il est remarquable de constater que cette saturation nécessite d'autant moins de plasma que la quantité d'hémoglobine utilisée est plus faible. Le tableau XXII indique qu'il faut deux fois plus de plasma (0,1 cm³) pour saturer 0,2 cm³ HbO₂ M/20.000, que pour saturer 0,2 cm³ HbO₂ M/40.000 (0,05).

TABLEAU XXII

*Saturation de solutions titrées d'hémoglobine
par des quantités différentes de plasma*

0,x cm ³ de plasma	Activité peroxydasique du mélange (plasma-HbO ₂)			
	HbO ₂ M/40.000	HbO ₂ M/30.000	HbO ₂ M/20.000	HbO ₂ M/10.000
0,04	1,82			
0,05	1,94	2,22	2,42	
0,06	1,92	2,38		
0,07		2,45		
0,08		2,45	2,99	
0,09			3,14	
0,10	1,88	2,43	3,20	
0,12			3,20	
0,15			3,10	2,95
0,18				3,18
0,19				3,30
0,20				3,38
0,22				3,38
Saturation en cm ³ de plasma...	0,05	0,07	0,10	0,20

La saturation de quantités variables d'hémoglobine chevaline par un même plasma est proportionnelle à la quantité d'hémoglobine mise en jeu, dans la gamme des concentra-

tions allant de 0,2 cm³ HbO₂ M/40.000 à 0,2 cm³ de HbO₂ M/10.000

La saturation se situe respectivement à 0,05 cm³ plasma 0,07 cm³, 0,1 cm³, 0,2 cm³, pour des concentrations en HbO₂ de M/40.000, M/30.000, M/20.000 et M/10.000.

Inversement, si on part d'une quantité fixe de plasma et que l'on ajoute des quantités croissantes de HbO₂, on obtient des activations qui sont proportionnelles aux concentrations de HbO₂ tant que celle-ci n'est pas en excès. Le tableau XXIII représente les résultats obtenus en utilisant des concentrations de HbO₂ allant de M/80.000 à M/1.000 en présence de quantités de plasma qui sont respectivement de 0,1 et 0,2 cm³. Par la méthode précédente, on a déterminé que 0,2 cm³ de plasma saturait 0,2 cm³ de HbO₂ M/20.000 et 0,1 cm³ de plasma : 0,2 cm³ de HbO₂ M/40.000. La première colonne du tableau représente l'iode dégagé en présence d'hémoglobine seule, la deuxième l'iode libéré par le mélange HbO₂ - 0,2 cm³ plasma. On constate que dans le premier cas, il n'y a pas de proportionnalité entre l'activité peroxydasique et la concentration de HbO₂

TABLEAU XXIII

0,2 cc. HbO ₂	I. N/100 HbO ₂ libre	I. N/100 HbO ₂ + 0,2 cm ³ pl.	Activ. rap. à 0,2 cm ³ pl.	I. N/100 en cm ³ 0,1 cc. pl. + HbO ₂	Activation rapportée à 0,1 cm ³ pl.
M/80.000	0,24	0,535	0,31	0,56	0,32
M/60.000	0,30	0,84	0,54	0,86	0,56
M/40.000	0,37	1,15	0,78	1,18	0,81
M/20.000	0,55	2,34	1,79	1,52	0,98
M/10.000	0,79	2,90	2,11	1,85	1,06
M/5.000	1,03	3,3	2,27	2,2	1,17
M/1.000	2,2	4,2	2	3,26	1,06

La proportionnalité est au contraire rigoureuse dans le second cas où les dégagements sont respectivement de 0,55, 1,15, 2,34 quand les quantités de HbO₂ introduites varient à chaque essai du simple au double.

Au-delà de la concentration de M/20.000, on note encore une augmentation de l'activité, mais celle-ci est loin d'être en rapport avec l'élévation de la concentration du catalyseur

puisque la quantité d'iode dégagé passe de 2,34 à 1,2 quand l'hémoglobine passe de M/20.000 à M/1.000.

La même constatation est valable pour la 4^e colonne qui représente l'activité du mélange HbO_2 - 0,1 cm^3 de plasma, mais ici la proportionnalité s'arrête à HbO_2 M/40.000, quantité qui représente la saturation de HbO_2 par le plasma. L'augmentation résiduelle constatée dans les deux cas au-delà de la zone de saturation est en rapport avec l'hémoglobine libre non combinée avec l'activateur plasmatique.

Mais pour interpréter logiquement ces résultats, il est nécessaire de connaître la nature de l'activateur plasmatique.

Le plasma perd par ultrafiltration, chauffage à 80°, et par défécation, sa propriété d'augmenter l'activation catalytique de l'hémoglobine. L'activateur est donc de nature protéique.

On peut l'isoler de l'ensemble des protéines plasmatiques en le précipitant par le sulfate d'ammoniaque.

Préparation de l'haptoglobine (87)

Les principaux temps de l'opération sont les suivants :

1° On recueille du sang artériel d'homme ou de chien sur oxalate, et on le centrifuge en prenant toutes les précautions utiles pour éviter l'hémolyse.

2° On ajoute, à 100 cm^3 de plasma, 90 cm^3 d'une solution saturée de sulfate d'ammoniaque pour éliminer la presque totalité des globulines qui ne contiennent pas l'activateur.

3° Sur une prise de 5 cm^3 du filtrat, on recherche, par tâtonnement, la quantité minimum de la solution de sulfate d'ammoniaque à ajouter pour précipiter la fraction des albumines contenant l'activateur. Après chaque essai, on mesure, par la méthode peroxydasique, la teneur du filtrat en activateur, 2 à 2,5 cm^3 de $\text{SO}_4^{+}(\text{NH}_4)_2$ en solution saturée suffisent pour en obtenir la presque totalité. Puis on additionne à la totalité du filtrat la quantité calculée de cette solution.

On obtient une floculation peu abondante, sous forme d'un trouble de la solution, qui centrifuge difficilement, si bien qu'on ne peut le séparer par cette méthode.

4° On le sépare par filtration sur un filtre à plis, opération

(87) M. POLONOVSKI et M.-F. JAYLE - C. R. 211 - 517 (1940).

qui demande 24 à 48 heures, car le précipité colmate la surface des filtres en raison de son état visqueux et gélatineux.

5° Le précipité, de l'ordre de 1 à 2 grammes par litre de plasma, est repris par 100 cm³ d'eau. On décolore par agitation en milieu neutre, avec quelques grammes de noir animal; on agite la solution avec 20 cm³ d'éther, on centrifuge et décante. La solution est enfin dialysée sur eau courante.

La purification peut être poussée plus loin par adsorption sur du kaolin en milieu acétique dilué ou mieux en milieu neutre sur l'hydrate d'alumine A préparé selon la méthode de WILLSTAETTER. L'élution est effectuée par une solution ammoniacale. Elle n'est pas quantitative.

La solution ammoniacale contenant l'activateur purifié est neutralisé; elle a permis d'élucider le mécanisme de son action sur une solution d'hémoglobine cristallisée de cheval M/20.000.

Le protide activateur se fixe sur l'hémoglobine de cheval et son sort lui est lié au cours de la précipitation fractionnée qui ne permet pas de dissocier le complexe. Cette faculté de se fixer sur HbO₂ est sans doute en rapport avec sa nature électropositive. Elle est à la base du nom de *haptoglobine* qui lui est attribué par M. POLONOVSKI et M.-F. JAYLE (de $\alpha\pi\tau\omega$ je me fixe sur).

La formation du complexe n'a lieu qu'à un pH supérieur à la neutralité. C'est pourquoi il est nécessaire de bien mélanger le plasma à la solution d'hémoglobine avant d'ajouter la solution citratée à pH 4.4. Le complexe une fois formé ne se dissocie pas en ses composants quand on abaisse le pH.

On peut admettre que la combinaison est équimoléculaire, c'est-à-dire qu'une molécule d'hémoglobine se combine à une molécule d'haptoglobine. En effet, l'examen du tableau XXI met en évidence que les additions croissantes de plasma à une quantité fixe de HbO₂ donnent des chiffres linéairement croissants : si on devait tenir plusieurs molécules d'haptoglobine comme responsables de cette activation, il est peu probable que la fixation de la 1^{re}, 2^e... et n^{me} se traduise par un diagramme linéaire.

Le tableau XXIII que nous avons déjà analysé page 124 ne semble pas prouver, à première vue, que la saturation pour 0.2 cm³ de plasma corresponde à 0.2 cm³ HbO₂ M/20.000, puisque l'augmentation de l'iode dégagé se poursuit jusqu'à la concentration de HbO₂ M/1.000.

En réalité, cet excédent d'activation au-delà de $M/20.000$ est en rapport avec l'activité catalytique de l'hémoglobine libre.

Ainsi, pour $0,2 \text{ cm}^3 \text{ HbO}_2 \text{ M}/10.000$, il y a la moitié de l'hémoglobine combinée à l'haptoglobine, l'autre moitié est libre. L'iode dégagé (2,9) correspond en effet à l'addition des activités séparées de ces catalyseurs ($2,34 + 0,79$).

Le raisonnement est encore valable pour le dernier chiffre de la 2^e colonne de ce tableau (4,2) qui représente l'iode dégagé sous l'influence du complexe $\text{HbO}_2 \text{ HG}$ (2,34) et de l'hémoglobine libre (1,9 environ), ainsi que pour la dernière colonne qui a trait à l'activation des mêmes quantités de HbO_2 par la moitié de plasma $0,1 \text{ cm}^3$. La preuve du rôle joué dans ces réactions par l'hémoglobine libre est donnée par les expériences suivantes :

Dans un premier essai on recherche l'activité peroxydasique du mélange $0,2 \text{ cm}^3 \text{ HbO}_2 \text{ M}/20.000 - 0,2 \text{ cm}^3 \text{ plasma}$. On trouve $2,45 \text{ cm}^3 \text{ I. N}/100$. Dans un 2^e essai on utilise $0,4 \text{ cm}^3 \text{ HbO}_2 \text{ M}/20.000$ et $0,2 \text{ cm}^3$ de plasma — on trouve $2,8 \text{ cm}^3$ — Dans un 3^e essai on mélange $0,2 \text{ cm}^3$ de plasma à $0,2 \text{ cm}^3 \text{ HbO}_2$. On ajoute la solution citratée à $pH \text{ } 1,1$ et $0,2 \text{ cm}^3 \text{ HbO}_2 \text{ M}/20.000$. On trouve encore $2,8 \text{ cm}^3$. On sait qu'à $pH \text{ } 4,4$, la combinaison $\text{HbO}_2 - \text{HG}$ ne se fait pas. Dans un 4^e essai on introduit la 2^e fraction d'hémoglobine d'après addition du peroxyde. Le chiffre trouvé est 2,45.

Ces essais prouvent d'une façon péremptoire que l'hémoglobine libre fonctionne catalytiquement à côté du complexe et est responsable du supplément d'activation observée sur le tableau XXIII, quand la saturation est dépassée, c'est-à-dire quand HbO_2 en excès est libre. Si dans le dernier essai on retrouve le même chiffre que dans le premier, c'est en raison du fait, sur lequel nous reviendrons, que l'iode inhibe l'action catalytique de l'hémoglobine libre à $pH \text{ } 4,4$.

C'est à cause de l'action peroxydasique surajoutée de l'hémoglobine libre, que le diagramme représentant l'activité du complexe $\text{HbO}_2 - \text{HG}$ - au cours de sa formation, par addition des quantités croissantes du plasma à une quantité fixe de HbO_2 , n'est pas rigoureusement linéaire. Le complexe n'est totalement formé qu'au niveau de la saturation. Auparavant on a toujours un mélange d'hémoglobine libre et combinée. Aussi l'iode dégagée par $0,2 \text{ cm}^3$ du complexe $\text{HbO}_2 - \text{HG} - \text{M}/20.000$ est-elle inférieure au double de l'iode dégagée par

0,1 cm³ de HbO₂ - HG - M/20.000 + 0,1 cm³ HbO₂ M/20.000 libre, catalyseurs en présence au moment de la demi-saturation.

On peut mettre à profit l'inhibition par l'iode de l'hémoglobine libre pour obtenir un diagramme rectiligne de l'action catalytique du complexe. Il suffit d'introduire au début de la réaction la quantité d'iode nécessaire à l'inhibition de HbO₂ libre qui comprend à 0,6 cm³ d'iode N/100 pour 0,2 cm³ de HbO₂ M/20.000. Dans ces conditions, seul le complexe HbO₂ - HG fonctionne comme catalyseur. Le tableau XXIV indique :

a) que l'activité de HbO₂ libre est très différente si l'iode dégagé est titré au fur et à mesure de sa libération pendant 5 minutes ou bien s'il est titré entre 4'30" et 5'. Les chiffres obtenus sont respectivement de 0,78 et 0,58;

b) que si au début de la réaction, on introduit 0 cm³ 58 d'iode N/100 on trouve au bout de 5' le même chiffre, ce qui prouve que le système a été totalement inhibé;

c) que le phénomène est inversé avec le complexe HbO₂ - HG - la quantité d'iode titrée au fur et à mesure est inférieure à celle que l'on trouve au bout de 5'. Ceci est en rapport avec l'inhibition de la catalyse par la tétrathionate; il suffit de remplacer l'hyposulfite par l'acide ascorbique pour trouver une activité sensiblement égale, que l'on dose l'iode au fur et à mesure, ou entre 4,30" et 5';

d) si on introduit, avant la mise en route de la réaction, une quantité déterminée d'iode, celle-ci ne modifie en rien la catalyse.

TABLEAU XXIV

Comparaison des activités catalytiques de HbO₂ et du complexe HbO₂ - HG en fonction du mode de titration de l'iode et du réducteur utilisé, pendant 5 minutes.

a) I. titré par hyposulfite N/100 - pH 4,4

	Titration progressive	Titration entre 4'30" et 5'
0,2 cm ³ HbO ₂ M/20.000 ...	0,78	0,58
0,2 cm ³ HbO ₂ -HG M/20.000	1,75	2,40
b) I. titré par l'acide ascorbique N/100 - pH 4,4		
0,2 cm ³ HbO ₂ M/20.000 ...	0,8	0,58
0,2 cm ³ HbO ₂ -HG M/20.000	2,75	2,65

Le tableau XXV indique les résultats obtenus en inhibant HbO₂ libre par l'introduction préalable de 0,7 cm³ I. N/100 pour 0,2 cm³ de HbO₂ M/20.000. De cette façon le diagramme d'activation, en fonction du plasma ajouté, est linéaire et se termine brusquement par un plateau au moment de la saturation (fig. 28. graphiques A₂ et B₂). La détermination de la saturation de 0,15 mg. de HbO₂ par un plasma faible (A₂) est à cet égard très significatif. A la ligne de raccordement imprécise obtenue avec la technique précédente (2) se substitue un angle obtus qui permet de délimiter exactement la saturation quand on introduit de l'iode au début de la réaction, c'est-à-dire quand on inhibe l'hémoglobine libre.

TABLEAU XXV

Plasma dilué ajouté à 0,2 cc. HbO ₂	I. N/100 HbO ₂ plasma	I. N/100 Témoin HbO ₂ + I. HbO ₂ plasma	U. I.	Saturation en cm ³ de plasma	U. I. rapporté à 0,1 cm ³ plasma	Indice d'haptoglobine H.G.
0,25	2,87	0,65	2,22	4		
0,10	2,28	»	1,63	0,125		
0,15	2,62	»	2	—	6,4	6,4

Plasma A au 1/4 :

0,05	1,45	0,65	0,8	
0,20	2,62	»	2	4

Plasma B au 1/4 :

0,10	1,75	0,65	1,10			
0,15	2,26	»	1,60	0,23		
0,20	2,40	»	2,05	—	4,4	4,2
0,25	2,87	»	2,22	4		
0,30	2,83	»	2,18			

Plasma C au 1/2 :

0,05	1,00	0,43	0,57			
0,06	1,14	»	0,71			
0,08	1,36	»	0,93	0,1		
0,1	1,65	»	1,22	—	2,28	2
0,12	1,68	»	1,25	2		
0,12	1,68	»	1,25			

On fait une véritable titration de l'haptoglobine en saturant une quantité constante d'hémoglobine que nous avons fixée à 0,2 cm³ d'HbO₂ cheval M/20.000. On ajoute des quantités croissantes du plasma ou de la solution d'haptoglobine et on trace la courbe (fig. 28). Plusieurs capsules sont placées à la file les unes à côté des autres; avec la même quantité d'hémoglobine (0,1 à 0,2 cm³ HbO₂ M/20.000) et on ajoute dans chacune d'elle sauf dans la dernière (témoin) des quantités croissantes de la solution d'haptoglobine en augmentant pour chaque essai de 0,2 à 0,05 cm³ de plasma dilué au 1/2 ou 1/4 (88).

On précise le taux exact de la saturation par le raisonnement suivant :

Entre 0,05 en plasma et 0,10 cm³ plasma l'activation observée (Tableau A) est de 0,83 cm³ d'I. N/100 donc 0,01 cm³ de plasma détermine une activation égale à 0,16 cm³ I. N/100.

Entre 0,10 cm³ et 0,15 cm³ de plasma, l'activation observée

est de 0,37, ce qui correspond à l'utilisation de $\frac{0,37}{0,16}$, soit 0,023 cm³ de plasma. Donc la saturation de 0,2 cm³ HbO₂ M/20.000 est obtenue avec 0,10 plasma + 0,023, soit : 0,123

— cm³ de plasma pur.

4

Par une simple règle de trois on peut ensuite évaluer moléculairement la concentration de l'haptoglobine dans le plasma.

0,123

En reprenant : $\frac{0,123}{4}$ — cm³ pl. correspond à 0,1 cm³ HbO₂

4

0,1

M/10.000. 0,1 cm³ pl. correspond à $\frac{0,1}{0,031}$ = 3,2 cm³ HbO₂

0,031

M/10.000. La concentration moléculaire du plasma en haptoglobine est donc égale à M/10.000 : 3,2 = M/3.125.

Il est plus commode de transformer cette expression compliquée en indice d'haptoglobinémie « H.G. » en posant que

I

l'unité de cette indice correspond à $\frac{1}{20.000}$ de molécule

20.000

d'haptoglobine. Une concentration M/10.000 sera égale à

2 H.G. et ainsi de suite. On a de la sorte une échelle de mesure simple et proportionnelle. Cette technique de dosage est valable pour une solution d'haptoglobine. A la rigueur elle convient encore pour un plasma dont l'indice H.G. est élevé. Par contre elle ne peut servir pour mesurer l'indice d'un plasma faible que si l'on introduit deux corrections.

1° La première a trait à l'hydroalcoyloperoxydase plasmaticque dont l'activité à pH 4,4 est encore notable. Sa mesure s'effectue en utilisant la même technique et en déterminant l'iode dégagé par la réaction catalysée par 0,25 cm³ de plasma. On retranche de ce chiffre en général inférieur à 0,3 cm³ d'iode N/100, l'iode dégagé par la réaction ROOH-IH non catalysée (0,1 cm³) : 0,3 - 0,1 cm³ = 0,2, chiffre que l'on rapporte à 1 cm³ du plasma, soit 8.

On le multiplie par la quantité de plasma mis en jeu dans chaque essai; on retranche ensuite du chiffre obtenu la valeur mesurée pour le mélange HbO₂ plasma.

2° La deuxième correction qui doit intervenir est en rapport avec l'absorption d'iode par le plasma. C'est cette absorption qui détermine, après la saturation, la portion descendante de la courbe et on peut au besoin la calculer à partir de cette chute de l'activation et la rapporter à 0,1 cm³ de plasma. Elle est variable selon les plasmas et oscille entre 0,05 et 0,2 cm³ d'iode N/100 pour 0,1 cm³ de plasma. Pour la déterminer exactement on ne peut utiliser l'absorption directe d'iode N/100 par le plasma mis en présence d'un excès d'iode. Il est nécessaire de se placer dans les mêmes conditions expérimentales.

Ex. 0,2 cm³ de HbO₂ cheval M/20.000 est saturé par 0,1 cm³ de plasma; l'iode N/100 libéré par le système est égal à 2,3 cm³.

On met 0,2 cm³ de la solution d'hémoglobine en présence de 0,2 cm³ et 0,4 cm³ de plasma, et on obtient 2 cm³ et 1,8 cm³ ce qui signifie que 0,1 cm³ de plasma a absorbé 0,1 cm³ d'iode N/100, chiffre qui doit être ajouté à l'activation de l'activité catalytique de HbO₂ par le plasma.

III. — *Influence du pH, de la concentration du peroxyde et de l'hémoglobine sur la cinétique de la réaction catalysée par le complexe « HbO₂ - H.G. ».*

Nous avons d'abord recherché l'influence du pH sur la catalyse de la réaction de peroxydation ROOH - IH par le

complexe « hémoglobine-haptoglobine » formé à partir de l'hémoglobine cristallisée de cheval et de l'haptoglobine préparée par la méthode décrite. Nous nous sommes placés dans les conditions expérimentales de la page 63.

Conformément au protocole observé pour l'hémoglobine, nous avons utilisé différents sels tampons (citrate, acétate, phosphate). Les résultats sont présentés dans le tableau XXVI.

TABLEAU XXVI

Activité catalytique comparée de HbO_2 et du complexe « HbO_2 - H.G. » en fonction du pH et exprimée en I. N/100

pH	Tampon citrate		Tampon acétate		Tampon phosphate	
	0,2 cm ³ HbO ₂ M/20.000	0,2 cm ³ « HbO ₂ -H.G. » M/20.000	0,2 cm ³ HbO ₂ M/20.000	0,2 cm ³ « HbO ₂ -H.G. » M/20.000	0,2 cm ³ HbO ₂ M/20.000	0,2 cm ³ « HbO ₂ -H.G. » M/20.000
3,2	0	2,20				
3,4	0	2,32			0,03	1,58
3,5	0,02	2,23	0	2,00	0,08	1,70
3,6	0,04	2,14	0,02	2,13	0,12	1,63
3,7	0,06	2,02			0,19	1,21
3,8			0,05	2,22		
3,9	0,10	1,82			0,42	0,80
4,0	0,27	1,56	0,07	2,02	0,76	0,44
4,2	0,47	1,06	0,20	1,70	1,03	0,07
4,4			0,42	1,24		
4,5	0,76	0,57				
4,6			0,77	0,58		
4,8	1,07	0,13	1,23	0,06		

A l'encontre de ce que nous avons observé pour l'hémoglobine, le pH optimum est différent pour les 3 sels employés. Il se situe à pH 3,4 avec le citrate, à pH 3,8 avec l'acétate, à pH 3,5 avec le phosphate. Ainsi, le pH est dévié dans tous les cas d'une unité vers l'acidité par rapport aux pH optima de HbO₂.

L'activité maximum du complexe « HbO₂ - HG » est identique dans les milieux de citrate et d'acétate (2,30 cm³ d'iode N/100). Elle est très inférieure en présence de phosphate (1,70 cm³ d'iode N/100) qui exerce un effet inhibiteur.

Ici encore, nous observons que le *pH* est fonction de la concentration en peroxyde : pour une concentration N/150, le *pH* optimum en milieu citraté était de 4,4 (page 116). Il s'abaisse d'une unité quand la concentration est inférieure à N/500. On peut invoquer l'effet destructeur du peroxyde à l'égard du catalyseur. C'est ce qui ressort de l'examen du tableau XXVII où les chiffres représentent le dégagement d'iode dosé à la fin de la première, deuxième, dixième minute.

Concentration moléculaire en peroxyde	Temps	Témoin	Dégagement d'I. N/100 par			C.A.	K _D
			0,2 cm ³ HbO ₂ + 0,15 cm ³ Haptoglobine	Acti- vation			
Peroxyde	1	1,00	3,65	2,65	3,65		
N/25	2	»	2,65	1,65	2,65		0,38
—	3	»	2,25	1,25	2,25		0,25
—	4	»	1,80	0,80	1,80		0,36
—	5	»	1,65	0,65	1,65		0,19
—	6	»	1,45	0,45	1,45		0,30
—	7	»	1,30	0,30	1,30		0,34
—	8	»	1,24	0,24	1,24		0,20
—	9	»	1,18	0,18	1,18		0,25
—	10	»	1,10	0,10	1,10		0,45
Iode dégagé pendant 10'			18,27	8,27	1,82	K _D en moy. = 0,30	
Peroxyde	1	0,50	2,20	1,70	4,4		
N/50	2	»	1,95	1,45	4		0,15
—	3	»	1,55	1,05	3,1		0,28
—	4	»	1,25	0,75	2,5		0,29
—	5	»	1,20	0,70	2,4		0,07
—	6	»	1,10	0,60	2,2		0,15
—	7	»	0,90	0,40	1,8		0,34
—	8	»	0,84	0,34	1,68		0,15
—	9	»	0,75	0,25	1,5		0,27
—	10	»	0,67	0,17	1,34		0,30
Iode dégagé pendant 10'			12,40	7,41	2,48	K _D en moy. = 0,22	

Concentration moléculaire en peroxyde	Temps	Dégagement d'I. N/100 par			C.A.	K _D
		Témoin	0,2 cm ³ HbO ₂ + 0,15 cm ³ Haptoglobine	Acti- vation		
Peroxyde	1	0,25	1,40	1,15	5,6	
N/100	2	»	1,25	1	5	0,14
—	3	»	1,10	0,85	4,4	0,15
—	4	»	1	0,75	4	0,12
—	5	»	0,91	0,66	3,6	0,12
—	6	»	0,82	0,57	3,3	0,14
—	7	»	0,73	0,48	3	0,15
—	8	»	0,65	0,40	2,6	0,17
—	9	»	0,60	0,36	2,4	0,09
—	10	»	0,56	0,31	2,24	0,14
Iode dégagé pendant 10'			9,02	6,52	3,6	K _D en moy. = 0,13
Peroxyde	1	0,10	0,70	0,61	7	
M/250	2	»	0,68	0,58	6,8	0,14
—	3	»	0,64	0,54	6,4	0,07
—	4	»	0,62	0,52	6,2	0,06
—	5	»	0,60	0,50	6	0,04
—	6	»	0,54	0,44	5,4	0,12
—	7	»	0,52	0,42	5,2	0,07
—	8	»	0,49	0,39	4,9	0,08
—	9	»	0,47	0,37	4,7	0,06
—	10	»	0,45	0,35	4,5	0,06
Iode dégagé pendant 10'			5,72	4,72	5,7	K _D en moy. = 0,08

Concentration moléculaire en peroxyde	Dégagement d'I. N/100 par					C.A.	K _D
	Temps	Témoin	0,2 cm ³ HbO ₂ + 0,15 cm ³ Haptoglobine	Acti- vation			
Peroxyde	1	0,05	0,45	0,40	9		
N/500	2	»	0,40	0,35	8		0,13
—	3	»	0,38	0,33	7,6		0,09
—	4	»	0,36	0,31	7,2		0,07
—	5	»	0,35	0,30	7		0,04
—	6	»	0,33	0,28	6,6		0,07
—	7	»	0,32	0,27	6,5		0,04
—	8	»	0,30	0,25	6,2		0,08
—	9	»	0,29	0,24	6		0,04
—	10	»	0,28	0,23	5,8		0,09
	Iode dégagé pendant 10'		3,52	3,02	7		K _D en moy = 0,06
Peroxyde	1	0,025	0,26	0,23	10		
N/1000	2	»	0,23	0,20	9,2		0,10
—	3	»	0,23	0,20	9,2		0,08
—	4	»	0,22	0,19	9		0,05
—	5	»	0,22	0,19	9		0,05
—	6	»	0,20	0,17	8		0,05
—	7	»	0,20	0,17	8		0,05
—	8	»	0,19	0,16	7,6		0,06
—	9	»	0,18	0,15	7,2		
—	10	»	0,17	0,14	7		0,07
	Iode dégagé pendant 10'		1,95	1,70	7,8		K _D en moy = 0,06

Le tableau XXVII a trait à l'influence sur la catalyse de la concentration du peroxyde que l'on fait varier de N/25 à N/1.000. On peut en tirer les déductions suivantes :

Le coefficient de destruction est d'autant plus petit que la concentration du peroxyde est plus faible. K_D varie entre 0,3 pour N/25 et 0,06 pour N/1.000. Pour les faibles concentra-

tions, il est voisin de zéro, ce qui signifie que la destruction est à peu près nulle. Il n'y a pas de proportionnalité entre l'activité et la concentration en peroxyde comme dans le cas de HbO_2 (fig. 29).

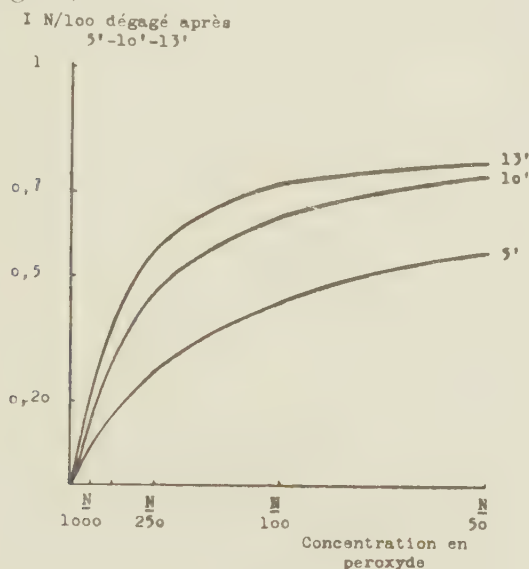


FIGURE 29

Activité catalytique de « HG-HbO₂ »

Les courbes (fig. 30) qui représentent, en fonction du temps, l'activité du catalyseur « HbO_2 - HG » à différentes concentrations de peroxyde, expriment la régularité de la catalyse pour les faibles concentrations auxquelles le dégagement d'iode est presque linéaire, comme le faisait prévoir le coefficient de destruction voisin de zéro. Au contraire, la forme devient parabolique quand le peroxyde dépasse N/500, et le logarithme de l'iode dégagé de minute en minute est linéairement décroissant, comme nous l'avons constaté avec les courbes d'activité de HbO_2 .

La différence fondamentale qui distingue le complexe HbO_2 - HG de l'hémoglobine est illustrée par la fig. 31 qui indique que, comme dans le cas de la peroxydase végétale, l'activité peroxydasique du complexe est proportionnelle à sa concentration jusqu'à 0,5 cm³ de HbO_2 M/20.000.

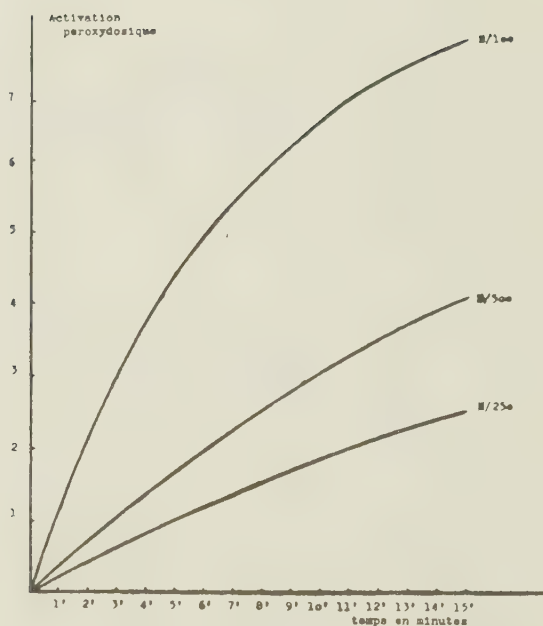


FIGURE 30
Activité du complexe HbO_2 -HG en fonction du temps
pour différentes concentrations de peroxyde

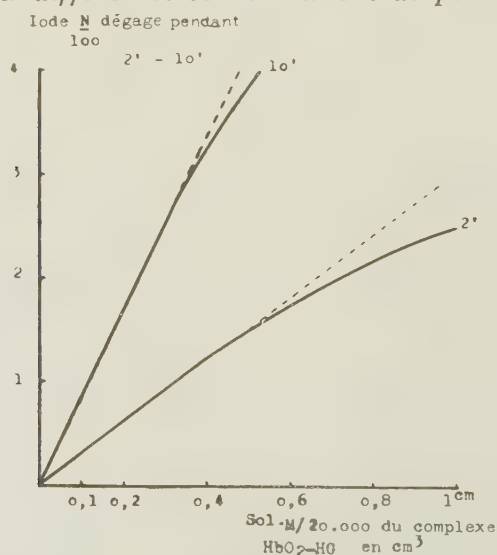


FIGURE 31
Influence de la concentration du complexe « HbO_2 -HG »
sur la catalyse peroxydasique

Par contre, en fonction de concentrations croissantes de peroxyde, on retrouve la même loi logarithmique de HbO_2 . La fig. 32 montre que les diagrammes représentatifs de $\log.$ de l'iode dégagé pendant 1', 2' et 3" en fonction du $\log.$ de la concentration du peroxyde, sont linéairement ascendants et correspondent à la loi des isothermes d'adsorption de FREUNDLICH.

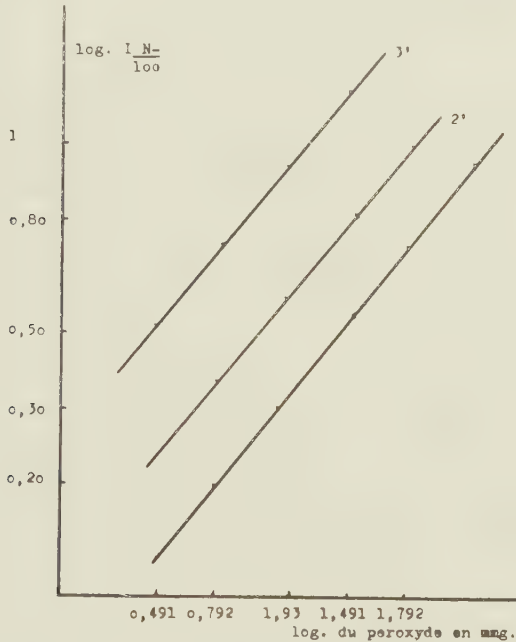


FIGURE 32
*Log. de l'activité de $\text{HbO}_2\text{-HG}$ en fonction du log.
des concentrations du peroxyde*

En résumé, l'haptoglobine, en se combinant à l'hémoglobine, modifie son comportement catalytique :

1° en diminuant d'une unité son $p\text{H}$ optimum d'activité peroxydasique.

L'augmentation de l'action catalytique de HbO_2 par l'haptoglobine est surtout nette à $p\text{H}$ 3,4, auquel l'activité de HbO_2 est très faible;

2° en rendant l'activité peroxydasique indépendante de l'iode libéré;

3° en augmentant la résistance de HbO_2 vis-à-vis de l'effet destructeur du peroxyde;

4° en établissant une proportionnalité rigoureuse entre la catalyse et la concentration du complexe;

5° en intensifiant l'activité peroxydasique de HbO_2 , comme le montre la fig. 33 qui représente l'iode dégagé par HbO_2 et « $\text{HbO}_2 - \text{HG}$ » à leur pH optimum respectif. Le diagramme presque linéaire du complexe s'oppose au diagramme curviligne de HbO_2 .

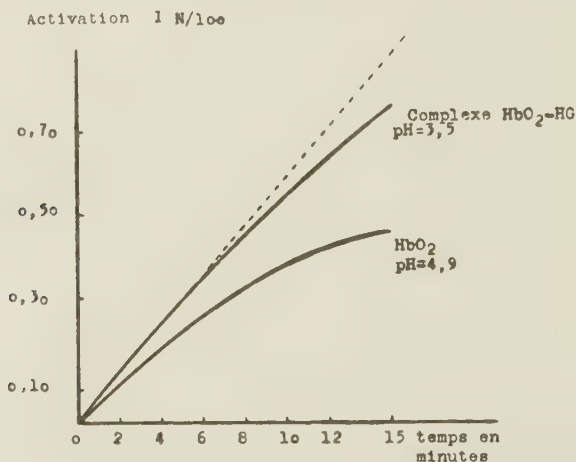


FIGURE 33

Comparaison de l'activité catalytique de HbO_2
et de « $\text{HbO}_2\text{-HG}$ » à leur pH optimum

TABLEAU XXVIII

Comparaison de l'activité catalytique de HbO_2 et $\text{HbO}_2 - \text{HG}$
à leur pH optimum

Temps	0,2 cm ³ HbO_2 M/20.000 saturé de HG (pH 3,4)	0,2 cm ³ HbO_2 M/20.000 non saturé (pH 4,9)
1 ^{re} minute	0,66	0,50
2 ^e »	0,64	0,47
3 ^e »	0,62	0,44
4 ^e »	0,58	0,40
5 ^e »	0,55	0,37
6 ^e »	0,52	0,33
7 ^e »	0,50	0,30
8 ^e »	0,48	0,27
9 ^e »	0,48	0,25
10 ^e »	0,46	0,22

La fixation sur l'hémoglobine du protéide plasmatique véritable coperoxydase, a transformé le pigment sanguin. peroxydase incomplète, en peroxydase vraie, fonctionnant au pH optimum des enzymes végétaux et possédant les mêmes propriétés essentielles : action durable, régulière, indépendante du pouvoir oxydant du milieu et de l'iode dégagé, et proportionnelle à la concentration du catalyseur.

Cette coperoxydase exerce sur l'hémoglobine une double influence :

a) Elle modifie son état physico-chimique, ce qui se traduit par un changement du pH optimum, l'indépendance à l'égard de l'effet inhibiteur de l'iode et la proportionnalité entre le catalyseur et l'action enzymatique;

b) Elle la protège contre la destruction oxydative du peroxyde, ce qui rend son action régulière et prolongée.

Le chromoprotéide sanguin est ainsi transformé en un enzyme parfait de peroxydation.

L'action de l'haptoglobine sur la myohémoglobine nous a, par contre, donné des résultats discordants, car nous n'avons pas obtenu le supplément d'activation que nous attendions en raison de l'identité de l'action catalytique de ce pigment avec l'hémoglobine. Il nous a malheureusement été impossible de confirmer nos premiers résultats à cause de l'obligation d'interrompre notre travail.

CONCLUSIONS GENERALES

Au cours de ce travail nous nous sommes particulièrement attaché à la recherche des raisons qui différencient l'action peroxydasique de l'hémoglobine de celle des peroxydases végétales.

1° Après avoir passé en revue les systèmes de peroxydation à catalyseurs minéraux et biologiques nous avons vu que la cause du comportement particulier de HbO_2 résidait essentiellement dans la fragilité du pigment sanguin à l'égard de l'effet oxydant du peroxyde. En traduisant la destruction de HbO_2 par le coefficient de destruction K_D nous avons rendu compte de la forme de décroissance exponentielle des courbes d'activité de HbO_2 qu'exprime la formule $y = e^{-Kt}$.

2° La déviation apparente du pH en fonction de la concentration du peroxyde et de l'élévation de la température est en rapport avec ce même processus de destruction. Nous avons précisé les conditions expérimentales dans lesquelles il faut se placer pour mesurer le pH optimum réel de la catalyse de la réaction $[\text{ROOH} - \text{I H}]$ par HbO_2 .

3° Nous avons vu également que si l'acide iodhydrique n'avait aucune influence sur la cinétique de la réaction, il en est autrement du pyrogalloï, du gaiacol et surtout de l'acide ascorbique qui, en se fixant sur HbO_2 , régularisent la catalyse.

En fait l'hémoglobine est une peroxydase incomplète qui n'acquiert le comportement d'une peroxydase vraie que par l'adjonction d'une substance complémentaire dont l'effet est de la protéger vis-à-vis du pouvoir oxydo-réducteur du milieu.

C'est ce que réalise l'haptoglobine (H.G.) protéide, plas-

matique, électropositif, qui se fixe, comme son nom l'indique, sur le chromoprotéide sanguin.

5° La cinétique de la catalyse par le complexe HbO_2 - H.G. est du même type que celle des enzymes végétaux : l'activité peroxydasique est proportionnelle à la concentration du catalyseur et la courbe d'activation en fonction de la concentration du catalyseur ou du peroxyde ne se traduit plus par la

loi des isothermes d'absorption ($a = \alpha c^{\frac{1}{n}}$), dont l'exposant $\frac{1}{n}$ — est caractéristique de l'affinité du peroxyde à l'égard du chromoprotéide sanguin.

L'hémoglobine s'avère être un modèle catalytique parfait pour l'étude de la catalyse enzymatique de peroxydation et son activité reflète l'influence du support protéique sur l'action peroxydasique de l'hématine. Elle représente l'étape intermédiaire entre l'hématine et la peroxydase vraie réalisée par l'adjonction d'une coperoxydase à son système d'oxydation.

En outre, la globine, en se combinant à l'hématine, spécialise son action catalytique dans le sens peroxydasique, car l'hémoglobine a perdu toutes propriétés catalysique et oxydasique, et son action peroxydasique s'est considérablement accrue.

L'haptoglobine protège l'enzyme de la destruction par le peroxyde et, en modifiant l'état physicochimique de l'hémoglobine, fait dévier, vers l'acidité, son pH optimum. Son rôle consiste essentiellement à permettre l'utilisation du dérivé d'oxydation supérieure dans une zone de pH où il est particulièrement instable et actif.

Quant à la myohémoglobine, elle a une activité catalytique identique à celle de l'hémoglobine.

TABLE DES MATIERES

ACTION PEROXYDASIQUE DE L'HEMOGLOBINE	
INTRODUCTION (PLAN GÉNÉRAL ET HISTORIQUE)	3
CHAPITRE PREMIER. — EXPOSÉ TECHNIQUE	43
a) <i>Préparation, réactions qualitatives et quantitatives des peroxydes. Catalyse minérale. Leur cinétique. Leur interprétation</i>	44
b) <i>Préparation et dosage de l'hémoglobine et de la myohémoglobine</i>	44
c) <i>Mise en évidence et méthodes de mesure des réactions peroxydasiques</i>	45
d) <i>Méthode d'expression de l'activité d'un peroxydase :</i>	
1° par la méthode de WILLSTAETTER et STOLL	57
2° par la méthode de BACH	58
3° méthodes diverses	60
4° par la méthode de M.-F. JAYLE	60
5° par la méthode volumétrique employée au cours de ce travail. Définition de l'activation et du coefficient d'activation	62
CHAPITRE II. — ÉTUDE DE L'ACTION CATALYTIQUE DE L'HEMOGLOBINE	67
A. <i>Activation comparée des différents peroxydes en présence de différents substrats</i>	68
B. <i>Variation de l'activité peroxydasique de l'oxyhémoglobine en fonction du pH</i>	71
1° le pH optimum suivant le sel tampon utilisé..	72
2° influence du pH sur la destruction de l'hémoglobine	76

3° déplacement apparent du <i>pH</i> optimum suivant la concentration du peroxyde et la température de la solution. Détermination des conditions expérimentales de la mesure du <i>pH</i> optimum réel de la réaction peroxydasique	78
4° concentration de l'hémoglobine et <i>pH</i> optimum	79
5° influence combinée de la température et du <i>pH</i>	80
6° influence du substrat et des réducteurs sur le <i>pH</i> optimum	81
C. <i>Etude systématique des facteurs influençant sur l'activité catalytique de l'hémoglobine</i>	85
1° influence de la concentration en iodure	85
2° variation de la concentration du peroxyde en présence de quantités constantes de l'hémoglobine	93
3° variation de la concentration de l'hémoglobine en présence de quantités constantes de peroxyde	98
4° variation de la température	103
D. <i>Comparaison de l'action catalytique des peroxydases végétales de la myohémoglobine et de l'hémoglobine</i>	109
<i>Etude mathématique des courbes d'activité de l'hémoglobine</i>	114
CHAPITRE III. — ETUDE DE L' h ^h APTOTOLOBINE	116
Haptoglobine mise en évidence	116
Préparation, nature et technique de dosage de l'haptoglobine	119
Influence du <i>pH</i> de la concentration du peroxyde et de l'hémoglobine sur la cinétique de la réaction catalysée par le complexe HbO_2-HG	130
CONCLUSION	141

DEUXIÈME THÈSE

Sur Constitution et Mécanisme d'action des Catalases

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 9 Janvier 1941.

Le Doyen de la Faculté des Sciences

CH. MAURAIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Le Recteur de l'Académie de Paris

J. CARCOPINO.

